

RELAÇÕES ENTRE FIXAÇÃO DE  $^{15}\text{N}_2$ , EVOLUÇÃO DE  $\text{H}_2$  E  
REDUÇÃO DE  $\text{C}_2\text{H}_2$  EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*, L.)

SIU MUI TSAI SAITO

Orientador: ENÉAS SALATI

Tese apresentada à Escola Superior de  
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade  
de São Paulo, para obtenção do título de  
Doutor em Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Outubro, 1978

Ao meu espôso Wilson,  
e meus filhinhos Daniel e Lin,

DEDICO

*Aos meus pais,  
que me mostraram o caminho da Ciência,*

MINHA HOMENAGEM

Ao Prof. Eneas Salati, pela confiança, estímulo e orientação e Dr. Eiichi Matsui, pelo constante apoio, amizade e sugestões oferecidas durante a realização do presente trabalho, meu

AGRADECIMENTO ESPECIAL

## AGRADECIMENTOS

- Ao colega Reynaldo L. Victória, pelas sugestões, críticas e colaboração oferecidas durante o desenvolvimento do trabalho;

- À Dra. Alaides P. Ruschel, pelas sugestões e compreensão, permitindo-me coordenar o trabalho com as atividades paralelas;

- Aos colegas Dr. Paulo L. Libardi e Dr. Virgílio F. do Nascimento F<sup>o</sup>, pelas críticas e auxílios prestativos na elaboração do trabalho;

- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), na pessoa do seu diretor Prof. Dr. Admar Cervellini, pelos materiais e facilidades oferecidas;

- À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), pelo apoio financeiro;

- Nossos sinceros agradecimentos pelos inestimáveis auxílios oferecidos, ao José Renato de Freitas e Paulo M. da Silva da Seção de Microbiologia do Solo;

- Ao técnico-químico Roberto Braidotti, Elizabeth Salmeron e Neusa M. Augusti da Divisão de Ciências Ambientais, respectivamente pelas análises, cálculos e datilografia.

- Aos demais componentes das eficientes e laboriosas equipes dos laboratórios da Seção de Microbiologia do Solo e Divisão de Ciências Ambientais, que muito colaboraram para a execução do presente trabalho;

- Aos amigos Celso A. Furlan, pelo auxílio nos desenhos e gráficos; Ivan S. de Almeida pelas análises estatísticas; Sra. Diva Athié, pela eficiente colaboração na redação em Inglês; Sra. Sônia Novaes Rasera,

pela datilografia e Benedito H. Davanzo, pela impressão do trabalho;

- A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, nossos sinceros agradecimentos.

## ÍNDICE

	<u>página</u>
1. RESUMO .....	1
2. INTRODUÇÃO .....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
3.1. Número e massa nodular e teor de leghemoglobina .....	7
3.2. Métodos de análises de N .....	7
3.3. Métodos usando substratos alternativos .....	9
3.3.1. A nitrogenase .....	15
3.3.2. A técnica da redução de acetileno .....	19
3.3.3. Medida da razão $C_2H_2:N_2$ reduzidos .....	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	26
4.1. Materiais .....	26
4.1.1. Plantas .....	26
4.1.2. Câmaras de incubação .....	27
4.1.3. Gases .....	27
4.2. Métodos .....	31
4.2.1. Redução de $C_2H_2$ .....	31
4.2.2. Evolução de $H_2$ .....	33
4.2.3. Medida da razão $C_2H_2:N_2$ .....	33
4.3. Cálculos de átomos (A) % $^{15}N$ em excesso, $N_2$ fixado, $C_2H_2$ reduzido, $H_2$ evoluído e razão $C_2H_2:N_2$ .....	37
4.3.1. Átomos (A)% $^{15}N$ em excesso .....	37
4.3.2. Medida da fixação de $N_2$ .....	38
4.3.3. Medida da redução de $C_2H_2$ .....	38

4.3.4. Medida da evolução de $H_2$ .....	39
5. RESULTADOS .....	42
5.1. Medidas da redução de $C_2H_2$ .....	42
5.1.1. Calibração da reta padrão de $C_2H_4$ .....	42
5.1.2. Fontes de erros nas medidas de redução de $C_2H_2$ em laboratório .....	47
5.1.2.1. Seringas .....	47
5.1.2.2. Erros do operador .....	47
5.1.2.3. Armazenamento das amostras .....	49
5.1.3. Linearidade da redução de $C_2H_2$ em função do tempo de incubação .....	49
5.1.3.1. Raízes noduladas de plantas de diferentes idades .....	52
5.1.3.2. Raízes noduladas vs plantas inteiras per- turbadas .....	52
5.1.3.3. Raízes noduladas vs plantas noduladas in- tactas .....	59
5.2. Evolução de $H_2$ .....	61
5.2.1. Em atmosfera Ar/ $O_2$ .....	61
5.2.2. Em ar .....	64
5.3. Medida das razões $C_2H_2:N_2$ reduzidos .....	64
5.3.1. Método I - Nas mesmas plantas .....	64
5.3.2. Método II - Em diferentes plantas .....	71
6. DISCUSSÃO .....	75



7. CONCLUSÕES .....	80
8. SUMMARY .....	82
9. LITERATURA CITADA .....	84
APÊNDICE .....	97

## LISTA DE TABELAS

	<u>página</u>
Tabela 1. Substratos alternativos catalizados pela nitrogenase ...	10
Tabela 2. Razões de conversão para $C_2H_2:N_2$ reduzidos, obtidos em diferentes organismos ou sistemas (diazotrofos) .....	23
Tabela 3. Determinação da reta padrão usando padrões de 10, 100 e 1000 vpm de $C_2H_4$ , totalizando 7 leituras por padrão. As médias de cada padrão estão acompanhadas pelos seus erros padrões ( $\bar{s}$ ) a 95% de probabilidade .....	43
Tabela 4. Determinação da reta padrão usando padrões de 100, 300 e 500 vpm de $C_2H_4$ . Os valores representam médias de 10 leituras por padrão $\pm$ desvio padrão (s), sendo que no final estão calculadas as médias de três padrões $\pm$ erro padrão da média ( $\bar{s}$ ) a 95% de probabilidade (Intervalo de Confiança) .....	45
Tabela 5a. Erro da seringa Hamilton na medida de 100 $\mu$ l de padrão de 500 vpm $C_2H_4$ , atenuação 16, range 100 .....	48
Tabela 5b. Erro das seringas plásticas na medida de 0,5 ml de padrão de 500 vpm $C_2H_4$ , atenuação 16, range 100 .....	48
Tabela 6a. Erro do operador usando seringas plásticas e injetando 0,5 ml de padrão de 500 vpm $C_2H_4$ , atenuação 16, range 100 .....	50

Tabela 6b. Variações das leituras de amostras de diferentes volumes de padrão de 100 vpm $C_2H_4$ , tomadas na mesma seringa plástica, na atenuação 2 e range 100 .....	50
Tabela 7. Vazamento das seringas plásticas contendo 0,5 ml de padrão de 500 vpm $C_2H_4$ em função do tempo de armazenamento. Altura dos picos em mm, atenuação 2, range 100 ..	51
Tabela 8. Linearidade da redução de $C_2H_4$ em função do tempo de incubação. Medidas feitas em raízes noduladas de plantas de diferentes idades, com médias de cada tempo de leitura $\pm$ desvio padrão (s) .....	53
Tabela 9a. Redução de $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$ de raízes noduladas e plantas inteiras perturbadas de 21 dias de idade, incubadas nas câmaras II a 24°C. As médias das 6 amostras de cada sistema estão acompanhadas pelos seus desvios padrões (s) e coeficientes de variação (C.V.) .....	55
Tabela 9b. Redução de $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$ de raízes noduladas e plantas inteiras perturbadas de 24 dias de idade, incubadas nas câmaras II a 28°C. As médias das 4 amostras de cada sistema estão acompanhadas pelos seus desvios padrões (s) e coeficientes de variação (C.V.) .....	56

Tabela 10. Teste incubando plantas com 45 dias de idade em tubo de ensaio (câmara III) em casa de vegetação, numa faixa de temperatura de 18 a 22°C durante o período de amostragem (9 - 11 horas da manhã), com 30 minutos de incubação .....	60
Tabela 11a. Evolução de H <sub>2</sub> em nódulos de feijão de 28 dias sob atmosfera Ar/O <sub>2</sub> (86,50% Ar, 13,16% O <sub>2</sub> , 0,24% N <sub>2</sub> e 0,09 % CO <sub>2</sub> ), a 26,5°C (Câmara V de incubação) em função do tempo de incubação .....	62
Tabela 11b. Evolução de H <sub>2</sub> em nódulos de 25 dias de idade sob atmosfera Ar/O <sub>2</sub> , a 26,5°C (Câmara V) .....	62
Tabela 11c. Evolução de H <sub>2</sub> em função do tempo de incubação em nódulos de 25 dias de idade sob atmosfera Ar/O <sub>2</sub> , a 26,5°C (Câmara V) .....	62
Tabela 12. Evolução de H <sub>2</sub> em ar em nódulos de plantas de 31 dias, desenvolvidas em vermiculita e areia em casa de vegetação, a uma faixa de temperatura do ar entre 15 - 35°C. Medida da evolução de H <sub>2</sub> em função do peso de nódulo / hora .....	65
Tabela 13. Evolução de H <sub>2</sub> em ar em nódulos de 34 dias de idade, nas câmaras VI, a 25°C por um período de 1 hora de incubação .....	67

- Tabela 14. Variação natural em  $^{15}\text{N}$  (átomos %  $^{15}\text{N}$ ) das plantas de feijoeiro com 21 dias de idade, usadas como controle .. 69
- Tabela 15. Fixação de  $^{15}\text{N}_2$ , evolução de  $\text{H}_2$  e redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  em nódulos de *Phaseolus vulgaris* L., pelo Método I. Razão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  e balanço eletrônico  $\text{C}_2\text{H}_4/(3\text{N}_2 + \text{H}_2)$  em nódulos de diferentes idades. As incubações foram feitas em 0,66 atm  $\text{N}_2$  (a 42,36 e 42,84% de enriquecimento em  $^{15}\text{N}$ ), 14%  $\text{O}_2$  e 0,45%  $\text{CO}_2$ , em ar e 0,1 atm  $\text{C}_2\text{H}_2$ , respectivamente para os três testes ..... 70
- Tabela 16. Medidas do N fixado, evolução de  $\text{H}_2$  em ar e redução de acetileno (10% v:v  $\text{C}_2\text{H}_2$ ) em raízes noduladas de *Phaseolus vulgaris* L. Razão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  e balanço eletrônico  $\text{C}_2\text{H}_4/(3\text{N}_2 + \text{H}_2)$  pelo Método II, usando as Câmaras VI de incubação ..... 72
- Tabela 17. Medidas do N fixado, evolução de  $\text{H}_2$  em ar e redução de acetileno (10% v:v  $\text{C}_2\text{H}_2$ ) em raízes noduladas de *Phaseolus vulgaris* L. de 37 dias. Razão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  e balanço eletrônico  $\text{C}_2\text{H}_4/(3\text{N}_2 + \text{H}_2)$  pelo Método II, usando as câmaras VI de incubação ..... 73

## LISTA DE FIGURAS

	<u>página</u>
Figura 1. Um esquema geral ilustrando reações da nitrogenase com $H^+$ , $C_2H_2$ ou $N_2$ como substratos .....	11
Figura 2. A nitrogenase e reações associadas em bacteroides de <i>Rhizobium</i> a alguns processos metabólicos nos nódulos .	14
Figura 3. Mecanismo da reação da nitrogenase .....	18
Figura 4. Câmaras I, II e III usadas para redução de $C_2H_2$ .....	28
Figura 5. Câmara IV utilizada para incubação com $^{15}N_2$ .....	29
Figura 6. Câmaras (Figuras 6a e 6b) utilizadas para incubação de $^{15}N_2$ , evolução de $H_2$ e redução de $C_2H_2$ . Tubo (Figura 6c) coletor de $H_2$ .....	30
Figura 7. Sistema de incubação com $^{15}N_2$ , em condições controladas de laboratório .....	35
Figura 8. Reta padrão de $C_2H_4$ , obtida através de injeções de amostras contendo diferentes concentrações de $C_2H_4$ (10, 100 e 1000 vpm), cada ponto representando a média de 7 leituras .....	44
Figura 9. Reta padrão de $C_2H_4$ , determinada por leituras de diferentes concentrações de $C_2H_4$ (100, 300 e 500 vpm). Cada ponto representa a média de três padrões de mesma concentração, tendo sido feito para cada padrão uma média de 10 leituras .....	46

Figura 10. Redução de  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$  por raízes noduladas de feijão de 31 e 41 dias de idade em função do tempo de incubação. Cada ponto representa a média de 2 - 3 amostras individuais, usando a Câmara I de incubação a 25°C. As barras verticais representam os desvios padrões das médias (s) ..... 54

Figura 11. Redução de  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$  de raízes noduladas vs plantas noduladas perturbadas, em função do tempo de incubação. Cada ponto representa a média de 6 plantas com 21 dias de idade, usando a Câmara II de incubação a 24°C. As barras verticais em cada ponto representam o desvio padrão das médias (s) ..... 57

Figura 12. Redução de  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$  de raízes noduladas vs plantas noduladas perturbadas, em função do tempo de incubação. Cada ponto representa a média de 4 plantas com 24 dias de idade, usando a Câmara II de incubação a 28°C. As barras verticais de cada ponto representam o desvio padrão das médias (s) ..... 58

Figura 13. Evolução de  $H_2$  em nódulos de 25 dias de idade e baixa  $pN_2$ , em função do tempo de incubação ..... 63

Figura 14. Evolução de  $H_2$  relacionada com peso de nódulos, incubados nas câmaras VI em atmosfera normal, com 32 dias de idade ..... 66

## 1. RESUMO

Foram estudados os três parâmetros - fixação de  $^{15}\text{N}_2$ , redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  e evolução de  $\text{H}_2$  para medida da fixação de  $\text{N}_2$  em nódulos de plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes idades, desenvolvidas em condições controladas de luz e temperatura.

A redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$ , cuja metodologia foi caracterizada em laboratório, foi positivamente correlacionada com o N fixado. Demonstrou-se que a técnica necessita de padronização rigorosa na amostragem e que deve ser criteriosa para minimizar os erros experimentais. Cuidados com a incubação dos nódulos (tempo, temperatura adequados) e armazenamento das amostras para cromatografia, podem diminuir muito as variações entre as repetições. Não foi encontrada diferença significativa na redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  pelos sistemas estudados - raízes noduladas, plantas inteiras perturbadas ou plantas intactas, na primeira hora de medida.

A medida da evolução de  $\text{H}_2$  foi detectada em nódulos com mais de 20 dias de idade, foi positivamente correlacionada com fixação de  $\text{N}_2$  e redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$ , sendo decisiva para manter o equilíbrio no balanço



eletrônico entre os três parâmetros estudados. A máxima evolução de  $H_2$  ocorreu entre 20-30 dias após plantio, nas condições de "fitotron".

Dois métodos foram aplicados para obtenção das razões  $C_2H_2$ :  
: $N_2$  e  $C_2H_4/(3N_2 + H_2)$ . No primeiro, valores entre 3,0 a 11,4 foram obtidos, incubando-se plantas inteiras perturbadas. O balanço eletrônico  $C_2H_4/(3N_2 + H_2)$  entre os dados variou de 1,57 a 1,75.

No segundo método, usando raízes noduladas de diferentes plantas para determinação do N fixado e redução de  $C_2H_2$ , as médias das razões  $C_2H_2:N_2$  estiveram entre 7,4 a 8,3 para todas as idades. O balanço eletrônico "in vivo"  $C_2H_4/(3N_2 + H_2)$  proporcionou valores superiores a 1, de 1,32 a 1,43. Estes dados sugerem que pode estar havendo uma superestimativa da fixação real de  $N_2$  pelo método da redução de  $C_2H_2$ . Neste caso, precauções devem ser tomadas ao se utilizar a técnica da redução de  $C_2H_2$  para estimativa da fixação de  $N_2$  em feijoeiro, uma vez que ela pode superestimar em média 32-43% do seu valor real.

Nódulos com idade entre 20 a 30 dias proporcionaram medidas dos três parâmetros (fixação de  $^{15}N_2$ , redução de  $C_2H_2$  e evolução de  $H_2$ ) com menores variações.

## 2. INTRODUÇÃO

O uso de um método adequado de medida na investigação de qualquer processo fisiológico ou bioquímico é fundamental e pode ser o fator preponderante para o sucesso de uma pesquisa.

O processo da fixação biológica de  $N_2$ , demonstrado pela primeira vez em 1888 por Hellriegel e Wilfarth na Alemanha, foi extensivamente estudado quanto a seus aspectos bioquímicos durante o período de 1928 a 1940. Com a possibilidade sugerida por Burris e Miller em 1941, do uso de  $^{15}N$  como traçador em estudos de fixação, as pesquisas sofreram um substancial impacto e muitos pesquisadores concentraram seus trabalhos na determinação dos organismos fixadores e os produtos primários da fixação. No período de 1940 - 1960, a preocupação residia mais na demonstração do mecanismo do que a sua quantificação ou aplicação prática, um vez que ficou demonstrado que o processo era bioquímico e controlado pela enzima nitrogenase.

Os estudos bioquímicos evidenciaram a versatilidade da nitrogenase, que podia reduzir muitos outros compostos além de  $N_2$ . A partir

da descoberta simultânea, por 2 grupos de pesquisadores em 1966 e 1967, de que o acetileno era inibidor não competitivo da fixação de  $N_2$  e que podia ser reduzido pela nitrogenase, foi desenvolvida uma técnica simples para medida da fixação de  $N_2$ . O método, se bem que indireto, trouxe um tremendo ímpeto em estudos de fixação em condições naturais.

A quantificação da fixação tornou-se importante quando se questionou os ganhos reais de N provenientes da fixação em proveito para a planta. Muitos pesquisadores verificaram um alto requerimento energético para fixação de  $N_2$ , sendo esse valor semelhante ao utilizado para absorção de N mineral. Além disso, verificaram em alguns casos, uma perda da eficiência na redução ao redor de 40 - 60% e que estava diretamente correlacionado com a evolução de  $H_2$  pelo sistema.

A técnica da redução de acetileno tem sido largamente empregada para determinação da fixação através da conversão teórica de 3:1 para  $C_2H_2:N_2$ . Se bem que o método seja muito sensível, os valores são somente estimativas da fixação.

As relações  $C_2H_2:N_2$ , obtidas por diversos autores variam dentro da faixa de 1,5 a 8,4. Nesses estudos, não foram incluídas medidas da evolução de  $H_2$ , o que pode acarretar em erros de até 50%.

O objetivo desse trabalho foi examinar e discutir a importância e as limitações dos métodos empregados para medida da fixação simbiótica de  $N_2$ , utilizando plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) de diferentes idades. A calibração do método de redução de  $C_2H_2$  foi feita com uso de  $^{15}N_2$  e medida de  $H_2$  evoluído.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

Para que se possa avaliar a fixação de  $N_2$  atmosférico por sistemas vivos, deve-se obter um aumento líquido de nitrogênio nos sistemas, suficiente para ser detectado pelos métodos diretos de N total. As dificuldades aparecem quando (i) a quantidade fixada corresponde somente a uma pequena fração do total do sistema; (ii) ocorre grande variabilidade do teor de N no material biológico; (iii) ocorre perda de N por processos biológicos ou químicos de desnitrificação ou lixiviação; (iv) existe possível envolvimento de compostos nitrogenados que resistem às análises ou erros analíticos. Essas dificuldades, discutidas por *BERGERSEN (1973)*, podem ser evitadas, em parte, quando são estudados somente sistemas simples e o produto da fixação é logo isolado.

Diversas técnicas foram aplicadas para medida do N fixado. Em um método gasométrico, usado por *HURWITZ e WILSON (1940)*, baseado na atividade respiratória do sistema, determinava-se ou não a fixação. Sua sensibilidade era muito baixa e após o aparecimento da técnica isotópica do  $^{15}N$ , não mais foi utilizado para essa medida. A utilização de  $^{13}N$  apresen

ta muitas dificuldades técnicas (ex. meia-vida curta, 10 min), ficando seu uso restrito à solução de problemas específicos. Os primeiros a usarem o isótopo radioativo  $^{13}\text{N}$  em estudos de fixação foram *RUBEN et alii* (1940), sendo depois utilizado ocasionalmente (por ex. *NICHOLAS et alii*, 1961). O uso de  $^{15}\text{N}$  tem sido usado com sucesso em experimentos de fixação, porém, com o advento da técnica da redução de acetileno introduzida por *HARDY et alii* em 1968, seu uso ficou restrito a demonstrações de novos sistemas fixadores, estudos de translocação do N fixado em plantas, alguns aspectos bioquímicos e fisiológicos da fixação, balanço de N em sistemas e calibração da técnica de redução de acetileno. A técnica da redução de acetileno, com precisão  $10^3$  superior ao método de  $^{15}\text{N}$ , é uma medida indireta da fixação e se utiliza da propriedade bioquímica do sistema fixador de reduzir substratos alternativos. Nessa medida, há uma superestimativa da fixação em sistemas que apresentam evolução de  $\text{H}_2$ . O método de espectrometria de emissão ótica de  $^{15}\text{N}$  (*FIEDLER e PROKSCH*, 1972), muito sensível e de baixo custo, não é aplicável a todos os tipos de experimentos. Para plantas noduladas, o número e a massa dos nódulos, assim como a concentração de leghemoglobina nos nódulos, podem ser estimativas da fixação (*CRISWELL et alii*, 1976). Porém o método isotópico de  $^{15}\text{N}$  permanece até o presente momento como o método final a ser utilizado em estudos qualitativos e quantitativos da fixação de  $\text{N}_2$ .

A seguir, descrevemos os métodos mais utilizados para determinação da fixação em leguminosas e os valores da razão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  obtidos por outros autores.

### 3.1. Número e massa nodular e teor de leghemoglobina

Essa classe de medidas, discutida por *CRISWELL et alii* (1976), é considerada a mais simples mas a menos quantitativa, e com a possível exceção do teor de leghemoglobina, nenhuma delas é recomendada. A concentração de hematina, determinada como hemocromagen piridina, que consiste principalmente de leghemoglobina e legmethemoglobina, fornece a melhor estimativa da fixação de  $N_2$ , mas em soja esta correlação decresce à medida que o crescimento vegetativo diminui e os nódulos senescem. A correlação existente entre o teor de hematina e o volume do tecido central efetivo de nódulos de várias plantas hospedeiras sugere ser a concentração da hematina somente um índice do volume de tecido ativo (*BERGERSEN, 1961*).

*Davidson, 1973*, citado por *CRISWELL et alii* (1976), confirmou que nem a medida de leghemoglobina nem o peso dos nódulos são critérios comparáveis com a metodologia da redução de acetileno para medidas de fixação. Problemas como idade da planta (*HARDY, et alii, 1971; JOHNSON e HUME, 1973*) e necessidade de uma metodologia eficiente para a extração completa da hematina (*WILSON e REISENAUER, 1963*), dificultam o uso da concentração de leghemoglobina como indicativo da fixação de  $N_2$ .

### 3.2. Métodos de análises de N

O tradicional método de Kjeldahl tem sido muito usado em medidas de fixação em solo, porém não distingue o N proveniente da fixação do proveniente do solo. Neste caso, há necessidade de uso de controles adequados para essa correção. Métodos corretivos foram testados em solos

com baixo teor de N, baixa população de bactérias naturais efetivas e usando sementes não inoculadas (BELL e NUTMAN, 1971; VEST, 1971) ou sementes inoculadas com uma estirpe inefetiva, em quantidade maciça para diminuir a ocorrência de bactérias naturais efetivas (BELL e NUTMAN, 1971). Esses métodos são aplicáveis somente no primeiro ano de experimentação, quando o número de estirpes de *Rhizobium* naturais do solo é baixo. Deve-se assumir que a bactéria inefetiva e efetiva consomem a mesma energia para sua manutenção na planta, diferindo somente na capacidade de fixação de  $N_2$  e que as plantas controles e eficientemente noduladas absorvem iguais quantidades de N do solo, uma estimativa que pode subestimar a fixação de  $N_2$  (CRISWELL et alii, 1976).

Para a soja, há outro método que utiliza isolíneas nodulantes e não nodulantes. A diferença de N total entre as duas isolíneas é um indicativo da fixação (HAM et alii, 1975; WEBER, 1966), mas as isolíneas não nodulantes apresentam sistema radicular mais desenvolvido que as nodulantes, o que acarretam diferenças nutricionais entre elas (WEBER, 1966).

Não se dispendo de isolíneas não nodulantes, outras leguminosas podem ser comparadas com plantas não leguminosas, que possuam necessidade em N semelhantes às leguminosas não inoculadas (BELL e NUTMAN, 1971; BROCKWELL, 1971).

A técnica de  $^{15}N$ ,  $10^3$  vezes mais sensível que o método Kjeldahl, é ainda o método direto e mais preciso para medir a fixação, não necessitando de correções para outras fontes de N. BURRIS e MILLER (1941) e BURRIS et alii (1942) foram os primeiros a desenvolver a metodologia para fins biológicos, uma vez que a nitrogenase não diferencia os gases  $^{14}N_2$

e  $^{15}\text{N}_2$ , nem cataliza uma reação de troca entre  $^{15}\text{N}_2$  e  $^{14}\text{N}_2$  (CRISWELL *et alii*, 1976). O método consiste na exposição por um tempo determinado do sistema fixador (nódulos destacados, raízes noduladas, plantas inteiras) a uma mistura de gases contendo  $^{15}\text{N}_2$ , mantida em uma câmara fechada. Todos os métodos envolvem a conversão final do N da amostra em gás  $\text{N}_2$ , que é transferido ao espectrômetro de massa para determinação da razão  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ . BURRIS e WILSON (1957) consideram significativos para fixação, os valores superiores a 0,015% átomos  $^{15}\text{N}$  em excesso.

A única desvantagem do método  $^{15}\text{N}$  é que ela exige o espectrômetro de massa, um equipamento mais dispendioso.

O único experimento usando  $^{15}\text{N}$  para determinação, por espectrometria de emissão ótica, da relação  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  foi feito em nódulos destacados de feijão de 5 semanas de idade e apresentou um valor de 4,75 (MACRAE, 1975).

### 3.3. Métodos usando substratos alternativos

A possibilidade da nitrogenase catalizar reações de redução de diferentes substratos além de  $\text{N}_2$  (Tabela 1), permitiu o desenvolvimento de um método sensível e rápido para determinar a atividade da enzima, sem se basear no N total. DILWORTH (1966) e SCHÖLLHORN e BURRIS (1967) foram os primeiros a verificarem quase simultaneamente que a nitrogenase catalizava a reação de redução  $\text{C}_2\text{H}_2$  a  $\text{C}_2\text{H}_4$ , sendo  $\text{C}_2\text{H}_2$  inibidor competitivo de  $\text{N}_2$ , processado numa reação análoga à redução de  $\text{N}_2$  a  $\text{NH}_3$ . Foi então proposto um método (HARDY e KNIGHT, 1967) utilizando substratos alternativos, preferencialmente  $\text{C}_2\text{H}_2$ , cujos produtos eram detectados por ionização de



chama de  $H_2$  em cromatôgrafo de gás. *HARDY et alii* (1968) introduziram o método para estudos de fixação em culturas e preparados de bactérias em laboratório e por leguminosas e bactérias de vida livre "in situ". *KOCH e EVANS* (1966) foram os primeiros a usar a técnica em nódulos de soja. O método é  $10^3$  a  $10^4$  vezes mais sensível que a técnica de  $^{15}N$  e o produto é analisado imediatamente, podendo o  $C_2H_2$  ser usado como padrão interno. O equipamento de cromatografia é relativamente portátil, simples e menos dispendioso que espectrômetro de massa (*HARDY et alii*, 1973). *HARDY et alii* (1968), discutem algumas desvantagens do uso da redução de  $C_2H_2$ , que incluem a natureza inflamável de  $C_2H_2$ , a necessidade de calibrações quantitativas de substratos e produtos gasosos e redução de  $C_2H_2$  a  $C_2H_4$  por sistemas não possuidores de nitrogenase ou conversão do etileno a outros produtos por bactérias utilizadoras de metano em sistemas aquáticos.

Tabela 1. Substratos alternativos catalizados pela nitrogenase.

Referências	
$N_2O + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow N_2 + H_2O$	<i>HOCH et alii</i> , 1960; <i>HARDY e KNIGHT Jr.</i> , 1966
$HN_3 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow N_2 + NH_3$	<i>SCHÖLLHORN e BURRIS</i> , 1966; <i>HARDY e KNIGHT Jr.</i> , 1967
$HCN + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow CH_4 + NH_3$	<i>HARDY e JACKSON</i> , 1967; <i>HARDY e KNIGHT Jr.</i> , 1967
$HCN + 4H^+ + 4e^- \longrightarrow CH_3NH_2$	<i>KELLY et alii</i> , 1967
$2H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$	<i>HOCH et alii</i> , 1957; 1960
$C_2H_2 + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow C_2H_4$	<i>DILWORTH</i> , 1966; <i>SCHÖLLHORN e BURRIS</i> , 1967

*DIXON* (1968) esclareceu o mecanismo de funcionamento das hi

drogenases existentes em nódulos de leguminosas. Usando nódulos de ervilha, concluiu que os mesmos continham pelo menos dois sistemas de hidrogenase separados, um envolvendo evolução de  $H_2$  e outro absorção de  $H_2$ . Concluiu também que a nitrogenase tem uma hidrogenase dependente de ATP associada com a enzima e a bactéria fixadora de  $N_2$  tem outra hidrogenase (uma enzima distinta) que normalmente funciona na reciclagem dos equivalentes redutores consumidos pela nitrogenase através da evolução de  $H_2$  dependente de ATP (DIXON, 1968, 1972). EVANS *et alii* (1977), esquematizaram a fixação da seguinte maneira (Figura 1):

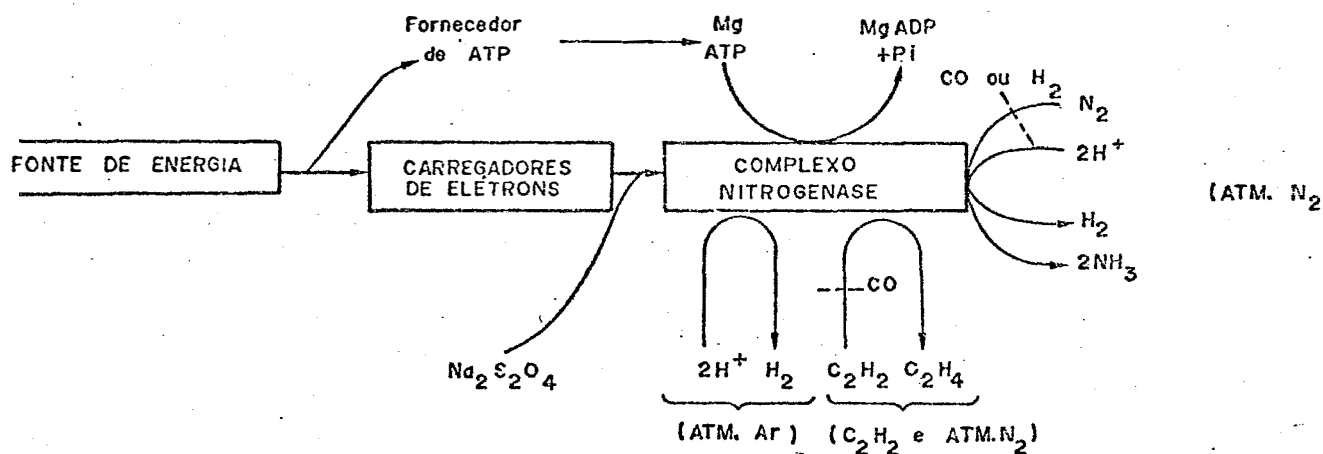


Figura 1. Um esquema geral ilustrando reações da nitrogenase com  $H^+$ ,  $C_2H_2$  ou  $N_2$  como substratos (EVANS *et alii*, 1977).

Desde a descoberta da evolução de  $H_2$  dependente de ATP pela nitrogenase (HOCH *et alii*, 1957 e 1960), muitos sistemas foram estudados sob esse aspecto (SCHUBERT e EVANS, 1976 e 1977).

De acordo com HOCH *et alii* (1960), uma  $pN_2$  de 0,3 atm cau-

sou um decrêscimo de 45% na taxa de evolução de  $H_2$  na ausência de  $N_2$  em nódulos de soja. Utilizando concentrações saturantes de  $C_2H_2$ , a formação de  $H_2$  e a redução de  $N_2$  são completamente inibidas e conseqüentemente, as taxas de redução de  $C_2H_2$  podem ser usadas para estimar a fixação (DART e DAY, 1971; BURRIS, 1974a; RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1975; BURNS e HARDY, 1975).

O  $C_2H_2$ , inibindo a reciclagem em  $H_2$  pela hidrogenase nos sistemas, acarreta importantes implicações no uso da redução de acetileno para fins de fixação.

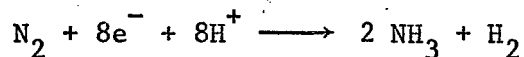
A evolução de  $H_2$  pela nitrogenase *in vivo* pode ser considerável. SCHUBERT e EVANS (1976), estudando a evolução de  $H_2$  em nódulos de leguminosas, concluíram que 40 - 60% do fluxo de elétrons utilizados pela nitrogenase foram transferidos para evolução de  $H_2$ . Em ausência de substratos redutíveis,  $H^+$  é reduzido a  $H_2$  pela nitrogenase (HOCH et alii, 1960; BURRIS, 1974a). O fornecimento de  $H^+$  é regulado por substâncias da planta hospedeira (REPORTER, 1978).

Como isto corresponde a uma energia gasta, não reutilizada, a eficiência relativa do sistema fixador não é nada mais que a fração do fluxo total de elétrons que passam pela nitrogenase que aparentemente é utilizada no processo da redução de  $N_2$  (SCHUBERT e EVANS, 1977), e que varia de acordo com a estirpe usada em associação com a planta (SCHUBERT e EVANS, 1976). Os mesmos autores propuseram uma equação simples para medida da eficiência dos sistemas fixadores (SCHUBERT e EVANS, 1976 e 1977):

$$ER = 1 - \frac{\text{taxa de evolução } H_2 \text{ no ar}}{\text{taxa de redução } C_2H_2}$$

ER = Eficiência relativa

Considerando  $H_2$  como produto obrigatório da redução de  $N_2$  a amônia, *SCHRAUZER (1977)* sugeriu um novo modelo de equação estequiométrica para fixação de  $N_2$ :



A capacidade de reciclar o  $H_2$  produzido pela nitrogenase parece ser determinada pela bactéria (*SMITH et alii, 1976; CARTER et alii, 1978*).

Um esquema completo (Figura 2) das reações envolvidas na utilização de energia pela fixação de  $N_2$  dentro do nódulo foi proposto por *EVANS e BARBER (1977)*.

*SCHUBERT e EVANS (1977)*, considerando o problema de grande variabilidade dos valores registrados por outros autores para a razão de moles de  $C_2H_2$  reduzido por mol de  $N_2$  fixado, atribuiu esse fato à falha na avaliação da magnitude da evolução de  $H_2$  pelos sistemas fixadores de  $N_2$ . *BERGERSEN (1970)*, obteve valores de 5,4 a 8,4 para nódulos de soja, *HARDY et alii (1973)* de 1,5 a 8,4 para nódulos de diferentes espécies de leguminosas. Em casos de altas perdas de energia (por ex.: 50%), correspondentes à fração de energia consumida para produção de  $H_2$  dependente de ATP, pode-se obter razões de 6 ao invés de 3. *SCHUBERT e EVANS (1977)*, admitem também que outras medidas utilizando dados extrapolados com tensões menores de  $C_2H_2$  podem resultar em erro. Os autores sugerem então, o uso de outros substratos alternativos, tais como prótons, porém, em muitos casos, o consumo de energia através da redução de prótons pela nitrogenase é análoga às perdas de energia pela fotorespiração em plantas com metabolismo  $C_3$

(ZELITCH, 1975). O método da redução de acetileno deve ser reconsiderado quando se quer determinar a razão de  $C_2H_2$  reduzido para  $N_2$  fixado, sendo obrigatoriamente necessário incluir a medida de  $H_2$  evoluído.

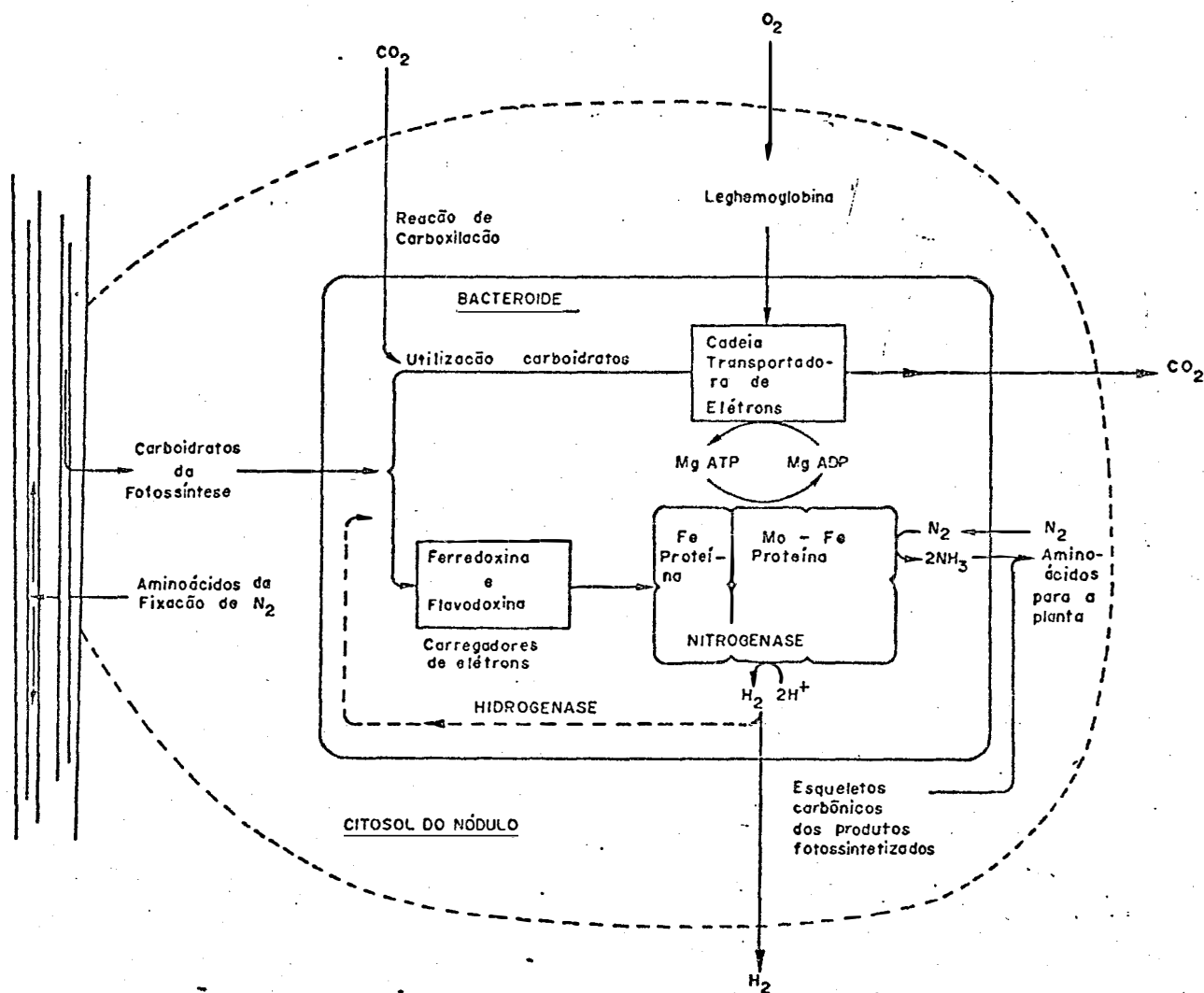


Figura 2. A nitrogenase e reações associadas em bacteróides de *Rhizobium* a alguns processos metabólicos nos nódulos (EVANS e BARBER, 1977).

### 3.3.1. A nitrogenase

O sistema da nitrogenase tem sido estudado desde 1960, quando foi obtido o primeiro extrato livre da enzima de *Clostridium pasteurianum* (CARNAHAN *et alii*, 1960). Após esse avanço, muitos outros aspectos da fixação foram estabelecidos (BURRIS, 1974b): a) a sensibilidade da enzima ao  $O_2$ , cuja presença pode inativá-la em poucos minutos; b) os estudos da nitrogenase devem ser realizados anaerobicamente; c) necessidade de uma fonte de poder redutor, tal como piruvato de sódio e uma fonte de energia (ATP); d) a oxidação de piruvato leva à redução de ferredoxina (ou Flavodoxina) que atua como carregador de elétrons para redução de  $N_2$  e à produção de acetil-CoA para formação de ATP; e) necessidade de  $Mg^{2+}$  para o funcionamento do sistema. Uma descoberta importante feita por BULEN *et alii* (1965) possibilitou a substituição do sistema doador de elétrons (Fd-hidrogenase) por ditionito de sódio, e utilização de creatina fosfato, creatina quinase e ADP como um sistema gerador de energia. Finalmente, a descoberta de que a nitrogenase reduz o acetileno a etileno por DILWORTH e SCHOLLHÖRN e BURRIS em 1966 e 1967, possibilitou o uso desse método muito sensível para estimativa da fixação.

O complexo enzimático da nitrogenase em nódulos está localizado inteiramente nos bacteroides (KENNEDY *et alii*, 1966; BERGERSEN e TURBER, 1967).

A nitrogenase foi isolada de muitos organismos diferentes, não variando muito porém entre os preparados de cada organismo quando purificados. Ela consiste de duas ferro-enzofre-proteínas, não possuindo atividade quando separadas. A primeira fração (fração 1 da eluição em celulo

se DEAE) consiste de uma molibdeno - ferro-proteína e a segunda (fração 2 de eluição em celulose DEAE) de uma ferro-proteína. A molibdeno-ferro-proteína tem peso molecular ao redor de 220000, contém por molécula 4 subunidades de dois tipos diferentes, 2 átomos de Mo e 24 de Fe e grupos de S lábeis em ácido. A fração 2 (ferro-proteína) é menor e tem peso molecular ao redor de 60000, tem 2 subunidades de mesma dimensão e 4 átomos de Fe e grupos de enxôfre por molécula. Estudos em condições de equilíbrio dinâmico sugerem que a ferro-proteína, quando complexada com ATP, transfere elétrons para a proteína maior, onde fica o sítio da redução. A fixação de  $N_2$  requer grandes quantidades de energia na forma de ATP para reduzir  $N_2$  *in vitro*. O ATP tem efeito alostérico sobre a Fe-proteína e induz uma mudança de conformação que possibilita sua transferência de elétrons para a Mo-Fe-proteína. Não se sabe porque e quando o ATP é hidrolizado a ADP durante o funcionamento da nitrogenase (YATES, 1976a).

Através de estudos cinéticos, HWANG *et alii* (1973) e RIVERA-ORTIZ e BURRIS (1975) mostraram que a redução de diversos substratos pela nitrogenase não segue um modelo único de comportamento. As respostas dos substratos e inibidores sugerem sítios diferentes para acomodar (RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1975):

- I)  $N_2$ ,  $H_2$ ,  $N_2O$  ( $H_2$  e  $N_2O$  inibidores competitivos de  $N_2$ )
- II)  $CN^-$ ,  $N_3^-$ ,  $CH_3NC$  (mutuamente competitivos, mas não competitivos com  $N_2$ )
- III)  $C_2H_2$  (não competitivos com  $N_2$  e  $N_3^-$ ;  $C_2H_2$  aumenta a redução de  $CN^-$ ,  $C_2H_2$  pode bloquear evolução de  $H_2$  completamente;  $N_2$  é competitivo com  $C_2H_2$ )
- IV) CO (não competitivo com substratos e não inibe redução  $H^+$ )

V) Evolução  $H_2$  (não idêntica ao sítio de  $N_2$ , uma vez que  $H_2$  não inibe essa evolução; único a não ser inibido pelo CO).

Analisando as respostas não recíprocas de  $N_2$  e  $C_2H_2$ , os autores sugerem que os dois substratos se ligam a sítios diferentes da nitrogenase e a inibição competitiva da redução de  $C_2H_2$  pelo  $N_2$  pode ser evitada quando se fornece  $C_2H_2$  em altas concentrações. O que pode acontecer é que para reduzir  $N_2$ , há necessidade de fornecimento de 6 elétrons pela molibdeno-ferro-proteína, enquanto que para reduzir  $C_2H_2$ , somente 2 elétrons são gastos. Essa inibição mútua acontece somente pelo fato de que estão utilizando um reservatório comum de elétrons (molibdeno-ferro-proteína). Concentrações saturantes de  $C_2H_2$  (0,1 atm) mantêm o reservatório exaurido de elétrons, não contendo mais de dois elétrons (não permitindo, pois, a redução de  $N_2$ ) enquanto que altas concentrações de  $N_2$  não podem impedir a redução de  $C_2H_2$ . Mantendo a Mo-Fe proteína com menos que dois elétrons, uma  $pC_2H_2$  alta pode inibir a evolução de  $H_2$ , enquanto que uma evolução de  $H_2$  ao redor de 23% não pode ser evitada em presença de  $N_2$ , através do escape de elétrons do reservatório, quando contiver dois, porém menos que seis elétrons. Essas observações enfatizam que há diferenças na redução de  $N_2$  e seus substratos alternativos, tal como  $C_2H_2$ .

Além disso, os  $K_m$  para  $N_2$  e  $C_2H_2$  são diferentes, dando um valor de  $0,136 \pm 0,003$  atm para  $N_2$  e  $0,012 \pm 0,002$  atm para  $C_2H_2$ , demonstrando que deve-se relacionar a redução de  $C_2H_2$  com redução de  $N_2$  com cuidado (RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1975).

Não se sabe ainda se estes sítios são fisiologicamente difere



rentes ou simplesmente modificações do mesmo sítio induzidas pelo substrato (YATES, 1976a).

Como a maioria das molibdeno-enzimas têm seu sítio ativo no Mo e complexos organo-metálicos contendo Mo e  $N_2$  podem ser sintetizados e o  $N_2$  nesses complexos pode ser reduzido a  $NH_4^+$  sob condições especiais, pensa-se, mas não está provado ainda, que o Mo é o centro ativo da nitrogenase (YATES, 1976a) (Figura 3).

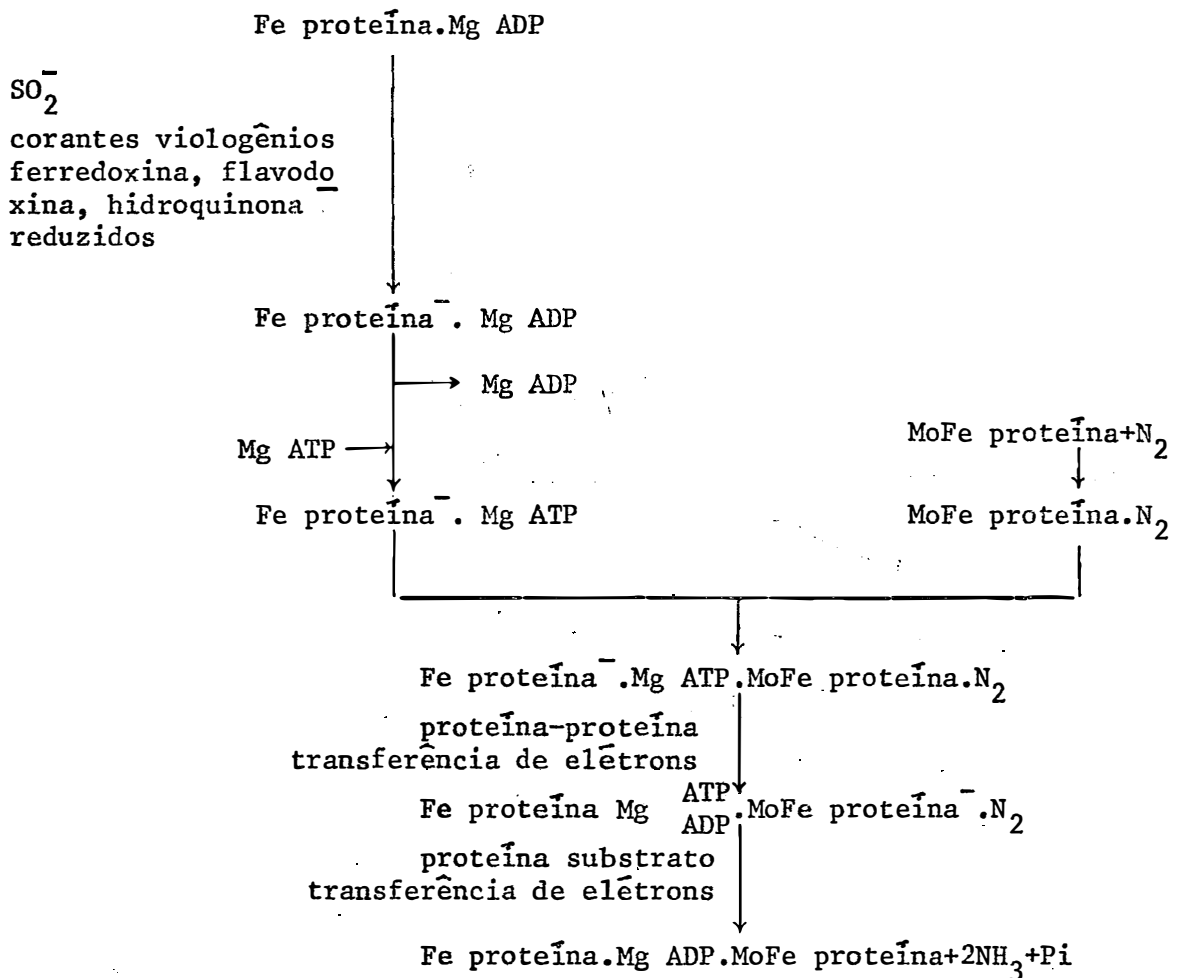


Figura 3. Mecanismo da reação da nitrogenase (YATES, 1976b).

### 3.3.2. A técnica da redução de acetileno

A técnica da redução de acetileno ( $C_2H_2$ ) tem sido aplicada em diferentes situações, onde estão incluídos estudos bioquímicos usando preparados de enzima purificada, estudos fisiológicos e ecológicos dos organismos ou sistemas fixadores de nitrogênio. Desde o seu primeiro uso em 1966, já foram publicados mais de 300 trabalhos utilizando o método para estimar a fixação de  $N_2$ .

Essa técnica tem numerosas vantagens sobre os métodos de  $^{15}N$  e Kjeldahl, porém deve-se considerar cuidadosamente os fatores que afetam essa medida, e controlá-los dentro do possível. *HARDY et alii* (1968) consideram que o método, quando devidamente aplicado, oferece vantagens e oportunidades para estudos dos fatores que afetam o funcionamento do sistema fixador em diferentes condições. Em estudos de quantificação de N fixado por esse método, através da conversão teórica da razão 3:1 para  $C_2H_2:N_2$ , não se considera a atividade real da nitrogenase para redução de  $N_2$ . Além disso,  $C_2H_2$  não é substrato biologicamente importante e enquanto que concentrações normais de  $C_2H_2$  para testes de redução inibem quase totalmente a produção de  $H_2$ , quando  $N_2$  é o substrato, alguns elétrons são usados para reduzir protons ( $H^+$ ) a  $H_2$  (*RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1975*). Em estudos quantitativos de fixação de  $N_2$ , deve-se incluir medidas da evolução de  $H_2$  pelo sistema. Muitos trabalhos realizados anteriormente apresentaram grandes variações da relação  $C_2H_2:N_2$  atribuindo-se, em parte, à ineficiência da bactéria em fixar  $N_2$  ou às condições ambientais desfavoráveis (*BERGERSEN, 1970; HARDY et alii, 1973; GIBSON, 1974*). Em casos onde ocorrem evolução de  $H_2$  ao redor de 50%, essa razão seria 6 e não 3.

Alguns aspectos devem ser considerados ao se utilizar essa metodologia:

a. *Luz* - Efeitos devido à intensidade de luz foram observados em diversos sistemas fixadores. Picos de máxima fixação sempre ocorrem após intensificação na iluminação (HARDY *et alii*, 1968; MINCHIN e PATE, 1974). BERGERSEN (1970) e MAGUE e BURRIS (1972) estudando raízes noduladas e nódulos destacados de soja, obtiveram picos de máxima e mínima atividades de acordo com a luminosidade. Quando os nódulos eram destacados, o efeito da luz era menor e mais transiente que no observado em raízes noduladas, mostrando que os nódulos apresentam uma taxa de atividade basal endógena, acima da qual é superimposta uma atividade estimulada pela presença de produtos fotossintetizados, que podem ser fornecidos através das raízes (BERGERSEN, 1970). Em condições controladas, a influência da luz na redução de  $C_2H_2$  é menos marcante (HARDY *et alii*, 1968; FISHBECK *et alii*, 1973).

Em estudos de fixação em condições de campo, deve-se fazer comparações entre tratamentos em um mesmo período do dia, preferencialmente após um determinado período de iluminação (GIBSON, 1974).

b. *Temperatura* - A temperatura ótima de incubação varia conforme a espécie de planta, sendo preferivelmente mais alta para plantas tropicais (DART e DAY, 1971). Para a maioria das plantas, atividades máximas são obtidas entre 20 a 30°C. Nódulos de feijão apresentam boa fixação entre 20 - 30°C, com pico máximo a 25°C (HALLIDAY, 1976). Deve-se levar em consideração a faixa de temperatura onde se desenvolve o experimento e ajustar a temperatura de incubação dentro dessa faixa de variação, por-

que plantas de mesma espécie se comportam diferentemente quanto à redução de  $C_2H_2$ , conforme a faixa de temperatura a que foram expostas (GIBSON, 1974).

- c. *Tensões de  $O_2$*  - Sabe-se que a fixação de  $N_2$  é inibida a tensões altas de  $pO_2$ , acima de 0,50 atm (BERGERSEN, 1970), mas taxas abaixo da concentração de  $O_2$  do ar também diminuem a atividade da nitrogenase. Em frascos pequenos e fechados, a respiração dos nódulos pode diminuir a  $pO_2$  e, conseqüentemente, reduzir a atividade da nitrogenase (SPRENT, 1969). Mantendo-se a  $pO_2$  constante através de adições de  $O_2$  ou fluxos de ar ou Ar/ $O_2$  nos frascos, pode-se manter as atividades dos nódulos nos seus níveis iniciais por um longo período. Caso contrário, a fase linear da redução de  $C_2H_2$  se resume em 1 - 2 horas de incubação (SPRENT, 1969 ; DART e DAY, 1971).
- d. *Teor de umidade* - A falta ou excesso de água são prejudiciais à fixação. Ambos efeitos podem ser relacionados com absorção de  $O_2$  (MINCHIN e PATE, 1975). Em condições de saturação de água, a absorção de  $O_2$  é restrita simplesmente como resultado de sua taxa menor de difusão em água que em ar. A presença de  $O_2$  nos nódulos é importante para estimular a atividade das células da planta hospedeira, resultando em aumento de atividade metabólica e maior suprimento de redutores e/ou ATP (SPRENT, 1971). HUANG et alii (1975) observaram que o efeito principal do baixo potencial de umidade na fixação de  $N_2$  é devido à diminuição de atividade fotossintética.
- e. *Sistemas estudados* - Medidas "in vitro" (preparações enzimáticas), "in vivo" (nódulos destacados, raízes noduladas, plantas inteiras) e "in si

tu" (plantas inteiras em condições de campo, em vasos ou em blocos de solo) já foram efetuadas por muitos autores, de acordo com a facilidade e necessidade de cada pesquisa. *CRISWELL et alii* (1976) sugeriram diversas aplicações para cada situação. Deve-se porém, cuidar em casos de extrapolação uma vez que foram obtidos resultados diferentes em cada tipo de sistema. Taxas de redução de  $C_2H_2$  são maiores em raízes noduladas que nódulos destacados (*BERGERSEN, 1970; MAGUE e BURRIS, 1972; FISH BECK et alii, 1973*), ou em blocos de solos (*HARDY et alii, 1968*). Plantas intactas são mais ativas que raízes noduladas (*MAGUE e BURRIS, 1972*).

### 3.3.3. Medida da razão $C_2H_2:N_2$ reduzidos

Muitos pesquisadores têm utilizado o método da redução de acetileno para estimar o valor do  $N_2$  fixado através do uso do  $C_2H_2$  reduzido e do valor teórico de conversão ( $C_2H_2$  reduzido: $N_2$  fixado) de 3,0. Alguns valores de  $C_2H_2:N_2$  obtidos em organismos ou sistemas fixadores estão na Tabela 2, que também inclui informações sobre os métodos de medida. A não ser que todas as condições experimentais sejam idênticas e adequadamente estabelecidas, os valores obtidos podem variar muito, uma vez que estamos trabalhando com sistema enzimático. *BERGERSEN (1970)* e *BURRIS (1972, 1974a)* alertaram os pesquisadores quanto ao uso do método para esse fim, enfatizando que a redução de  $^{15}N_2$  é o método primário a ser usado para validade de resultados obtidos pela redução de acetileno ou outros métodos indiretos de medida de fixação de nitrogênio. Dão ênfase também para uso de idênticas condições experimentais nas medidas de  $^{15}N_2$  e redução de acetileno.

Tabela 2. Razões de conversão para  $C_2H_2:N_2$  reduzidos, obtidos em diferentes organismos ou sistemas (diazotrofos).

Diazotrofos	$C_2H_2:N_2$	Métodos de Estimativa	Referências
<b>Nitrogenase</b>			
<i>Azotobacter vinelandii</i>	3, 7-4, 2	$C_2H_2$ , $N-NH_3$	HARDY et alii, 1968
	3, 18	$C_2H_2$	Kluwe, 1967 (cit. por STEWART et alii, 1967)
<i>Clostridium pasteurianum</i>	2, 5	$C_2H_2$ , $N-NH_3$	SCHÖLLHORN e BURRIS, 1967
	3, 9-4, 9	$C_2H_2$ , N-proteína	DILLMORTH, 1966
<b>Bactérias</b>			
<i>Azotobacter vinelandii</i>	6, 0	$C_2H_2$ , $^{15}N_2$	BERGERSEN, 1970
	3, 0-4, 5	$C_2H_2$ , $N-NH_3$	HARDY et alii, 1968
<i>Klebsiella aerogenes</i>	3, 0	$C_2H_2$ , $^{15}N_2$	BERGERSEN, 1970
<b>Algas</b>			
<i>Anabaena cylindrica</i>	2, 8	$C_2H_2$ , $^{15}N_2$	STEWART et alii, 1968
<i>Anabaena flos-aquae</i>	3, 2	$C_2H_2$ , $^{15}N_2$	STEWART et alii, 1968
<i>Anabaena azollae</i>	2, 5	$C_2H_2$ , $^{15}N_2$	PETERS et alii, 1977
<i>Nostoc muscorum</i>	3, 6	$C_2H_2$ , $^{15}N_2$	STEWART et alii, 1968
<b>Leguminosas</b>			
<i>Glycine max</i>			
nódulos destacados	3, 9	$C_2H_2$ , $^{15}N_2$	STEWART et alii, 1967
	5, 4-8, 4	$C_2H_2$ , $^{15}N_2$	BERGERSEN, 1970
	2, 0	$C_2H_2$ , $^{15}N_2$	MAGUE e BURRIS, 1972

Tabela 2. (continuação)

Diazotrofos	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub>	Métodos de Estimativa	Referências
raízes noduladas	2,3	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , Kjeldahl	HARDY <i>et alii</i> , 1971
	0,59	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , Kjeldahl	GIBSON, 1974
<i>Pisum arvense</i>			
raízes noduladas	1,7-3,5	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , N <sup>15</sup> -NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	OGHOGORIE e PATE, 1971
<i>Trifolium subterraneum</i>			
raízes noduladas	1,5-3,7	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , Kjeldahl	ROUGHLEY e DART, 1969
	1,8-2,8	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , Kjeldahl	GIBSON, 1974
plantas intactas	2,4-6,0	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , Kjeldahl	SINCLAIR, 1976
<i>Trifolium repens</i>	3,6-4,1	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , Kjeldahl	SINCLAIR, 1973
	1,7-6,8	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , Kjeldahl	SINCLAIR, 1976
<i>Lupinus</i>			
raízes noduladas	2,9	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , Kjeldahl	GIBSON, 1974
	4,2	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	SPRENT e SILVESTER, 1973
<i>Phaseolus vulgaris</i>			
raízes noduladas	2,0	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , Kjeldahl	RUSCHEL e RUSCHEL, 1973
nódulos destacados	4,75	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	MacRAE, 1975
Não leguminosas			
<i>Alnus glutinosa</i>	2,3	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	AKKERMANS, 1971 (cit. por HARDY <i>et alii</i> , 1973)
<i>Azolla x Anabaena</i>	1,7	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub>	PETERS <i>et alii</i> , 1977

Em média, os dados dos fatores para nitrogenase *in vitro* é 3,6; 3,2 para algas; 4,3 para bactérias; 3,9 para leguminosas; 2,4 para não leguminosas (HARDY *et alii*, 1973) e 1,7 para *Azolla* em associação com *Anabaena* (PETERS *et alii*, 1977).

Em plantas de feijão, a razão 2 obtida por RUSCHEL e RUSCHEL (1975) demonstra haver uma subestimativa da medida pelos métodos de  $C_2H_2$  e Kjeldahl, fator este que aumenta com a idade da planta. Pelos dados obtidos, a melhor época para avaliação pelo método do acetileno é aos 35 dias e por Kjeldahl aos 50 dias. MacRAE (1975), estudando nódulos destacados de feijão de 35 dias, obteve o valor de 4,75, usando  $C_2H_2$  e  $^{15}N_2$ , medido por espectrometria de emissão ótica.

HAUCK e BREMNER (1976), além de concordarem com Bergersen e Burris, enfatizam também a necessidade do uso de controles adequados na técnica da redução de acetileno, pois uma revisão geral de centenas de trabalhos usando essa técnica indicou que poucos fizeram experimentos controles para comprovar que o sistema fixador de  $N_2$  sob estudo não produz etileno na ausência de acetileno ou não absorve etileno produzido pela redução de acetileno. Estudos em solos ou outros sistemas naturais demonstraram poder ocorrer transformação de etileno por outros organismos (FLETT *et alii*, 1975) ou pode produzir etileno na ausência de acetileno. KAVANAGH e POSTGATE (1970), demonstraram a necessidade de verificar os materiais usados quanto à produção de etileno, uma vez que a borracha tanto pode absorver quanto evolover o gás.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Plantas

Plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivar Venezuela-350, foram desenvolvidas em câmara de crescimento em regime de 13 horas de fotoperíodo, à intensidade de 30000 lux ( $35 \text{ w/m}^2$ ) fornecidas por lâmpadas fluorescentes e incandescentes (400-700 nm), temperatura a 25-22°C e umidade relativa do ar a 50%-60%, respectivamente para dia e noite. Os vasos, contendo vermiculita e areia (2 : 1, v/v), previamente lavadas durante 2 dias, receberam solução isenta de nitrogênio (McKNIGHT, 1949) na proporção de 25% do seu volume. Reposições de água eram feitas diariamente. Foi feita uma inoculação maciça com a estirpe selecionada de *Rhizobium phaseoli* C-29 (= 127-K17, Nitragin Co., EUA) em sementes esterilizadas por 5 minutos em 0,2% HgCl<sub>2</sub> acidificado e lavada várias vezes com água esterilizada. Esse procedimento era realizado semanalmente (em três semanas sucessivas) para obtenção de nódulos de diferentes idades.

#### 4.1.2. Câmaras de incubação

Diferentes câmaras de incubação (Figuras 4, 5 e 6) foram usadas nos testes, sendo seus usos assim subdivididos:

Câmaras	Medida	Figuras
I, II, III	$C_2H_2$	4a, b, c
IV	$^{15}N_2, H_2$	5
V	$^{15}N_2$	6a
VI	$^{15}N_2, H_2, C_2H_2$	6b

#### 4.1.3. Gases

Todos os gases para incubação ( $Ar/O_2$  e  $C_2H_2$ ) foram adquiridos da White Martins S.A.. O  $^{15}N_2$  foi obtido através de reação de  $(^{15}NH_4)_2SO_4$  a 96,4% átomos em excesso (Junta de Energia Nuclear, Madrid-Espanha) com hipobromito de sódio (*TRIVELIN et alii, 1973*). Em alguns testes com  $^{15}N$  foi usada uma mistura preparada de gases armazenada em cilindro (67,25%  $^{15}N_2$  a 42% átomos em excesso, 14%  $O_2$ , 18,3%  $Ar$  e 0,45%  $CO_2$ ). Em outro teste, um gás puro de  $^{15}N$  era injetado nos frascos, sendo a composição gasosa de cada frasco determinada por espectrometria de massa.

Padrões de  $C_2H_4$  (Messer Griesheim, Hamburgo - Alemanha, 99,95% pureza) foram preparados a diferentes concentrações (10, 100, 300, 500 e 1000 vpm) para determinação da reta e o padrão de 500 vpm foi utilizado em todos os testes de redução de  $C_2H_2$  em nódulos. O padrão de  $C_3H_8$  foi também obtido da Messer Griesheim, Hamburgo - Alemanha.

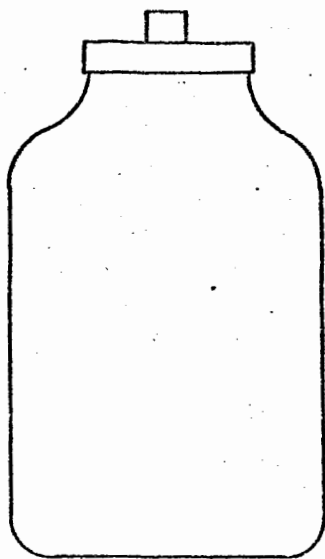


Figura 4a. Câmara I

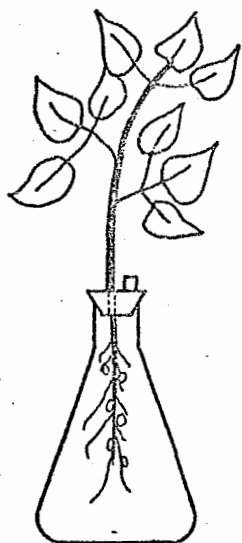


Figura 4b. Câmara II

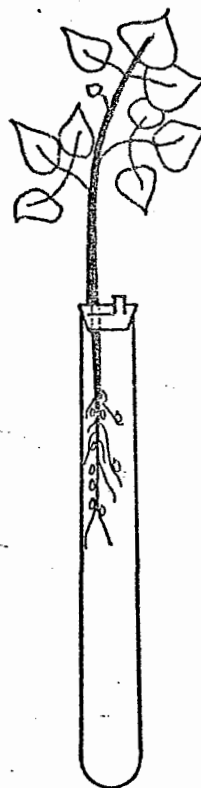


Figura 4c. Câmara III

Figura 4. Câmaras I, II e III usadas para redução de  $C_2H_2$ .

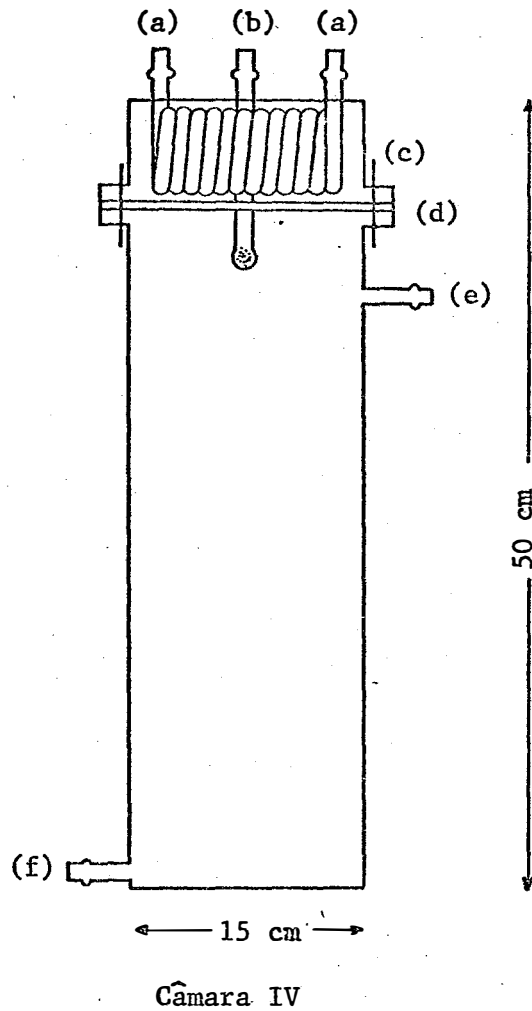


Figura 5. Câmara IV utilizada para incubação com  $^{15}\text{N}_2$

- (a) Entrada e saída de água para circulação
- (b) Entrada de água para irrigação interna
- (c) Serpentina de vidro para refrigeração
- (d) Conexão entre as partes da câmara com anel "O-ring"
- (e) Saída da mistura gasosa para bomba de circulação
- (f) Admissão da mistura gasosa

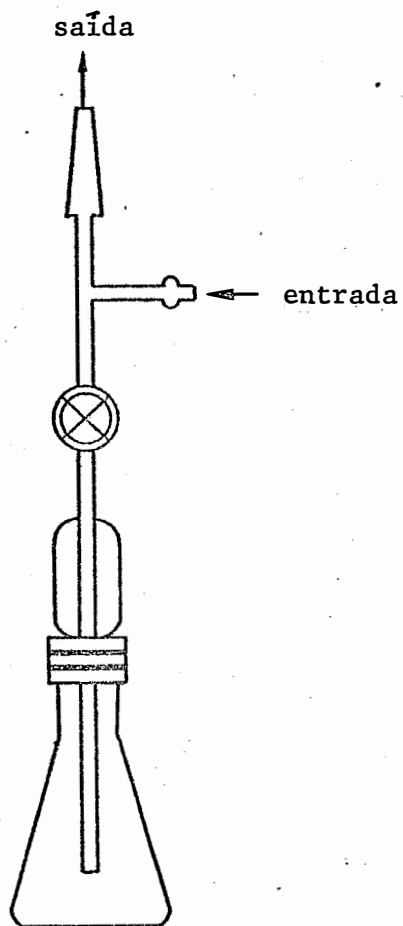


Figura 6a. Câmara V

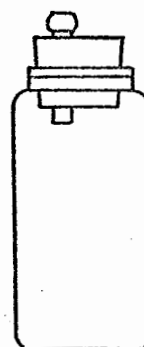


Figura 6b. Câmara VI



Figura 6c.

Figura 6. Câmaras (Figuras 6a e 6b) utilizadas para incubação de  $^{15}\text{N}_2$ , evolução de  $\text{H}_2$  e redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$ . Tubo (Figura 6c) coletor de  $\text{H}_2$ .

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Redução de $C_2H_2$

Os testes de redução de  $C_2H_2$  incluíram estudos da reta padrão de  $C_2H_4$ , linearidade da redução de  $C_2H_4$  em função do tempo de incubação, redução de  $C_2H_2$  em diferentes sistemas de plantas (raízes noduladas, plantas noduladas perturbadas, plantas noduladas intactas) e estudos das fontes de erro dessa medida em laboratório.

Para obtenção da reta de  $C_2H_4$ , foram preparados quatro padrões de 100, 300 e 500 vpm de  $C_2H_4$  e determinadas 9 - 10 amostras para cada padrão. Foram calculados os erros padrões da média a 95% de probabilidade (PIMENTEL GOMES, 1968; 1973).

As análises da redução de  $C_2H_2$  foram feitas com cromatógrafo de gás Beckman Modelo GC-65 usando detector de ionização de chama de  $H_2$  a  $175^{\circ}C$ , com coluna de vidro de 1/8 pol (diâmetro interno) x 1,60 m contendo Porapak N de 80 a 100 mesh a  $110^{\circ}C$ . Como gás carregador foi usado  $N_2$  a um fluxo de 40 ml/min, velocidade no cromatograma de 12,70 mm/min. O tempo de aparecimento dos picos de  $C_2H_4$  e  $C_2H_2$  são respectivamente 35 e 60 segundos após injeção. Um cromatograma completo, incluindo o pico do propano -  $C_3H_8$  - usado como padrão interno (BALANDREAU e DOMMERSGUES, 1973) figura no Apêndice I.

Estudando-se as fontes de erro da redução de  $C_2H_2$ , foram feitos testes com padrões de  $C_2H_4$ , onde foram medidas as variações decorrentes do uso de diferentes seringas, o tempo máximo para armazenamento da

amostra nas seringas e os erros do operador.

Determinou-se a linearidade da redução de  $C_2H_2$  em função do tempo de incubação em diferentes sistemas (plantas decapitadas e plantas inteiras perturbadas) e em plantas decapitadas de diferentes idades, uma vez que os estudos de fixação só devem ser aplicados na faixa linear da curva de produção de  $C_2H_4$ . Nesses testes foram utilizadas as câmaras de incubação I e II.

Frascos com tampas de rosca de alumínio (Câmara I) de 500 e 1000 ml de volume foram adaptados para permitirem incubações com 10% de  $C_2H_2$  de plantas decapitadas e plantas inteiras perturbadas de feijão, sem alterações internas de temperatura e umidade. As tampas eram perfuradas e rolhas de borracha "serum cap" de 15 mm de diâmetro eram colocadas no orifício (Figura 4a). A cada 20 - 30 minutos eram retiradas amostras de 0,5 ml de gás em seringas *Terumo* de 1 ml, que eram imediatamente armazenadas por curto período (máximo de 1 hora), ficando-se as agulhas em rolhas numeradas de borracha. Testes com plantas de diferentes idades também foram feitos nessa câmara I.

A câmara II (Figura 4b) foi usada para testes de plantas de capitadas e inteiras e consiste de frasco Erlenmeyer de 300 ml (nominalmente 250 ml) com tampas de borracha para soro e perfuradas para permitirem in cubações de plantas inteiras, com as partes aéreas das plantas mantidas fo ra dos frascos. Ao redor do caule, na altura da tampa, era colocada "Apiezon" para vedação. Uma perfuração adicional, vedada com rolha de borracha "serum cap", era feita para amostragem (Figura 4b).

Testes em blocos de solo contendo plantas noduladas de feijão foram feitos em casa de vegetação e campo utilizando a câmara III que constitui de tubo de ensaio de 36 mm de diâmetro e 300 mm de altura (volume de 300 ml). A tampa de borracha (para soro) foi perfurada em dois locais - um orifício para a planta e outro para amostragem (Figura 4c).

#### 4.2.2. Evolução de H<sub>2</sub>

As medidas da evolução de H<sub>2</sub> incluíram incubações de raízes noduladas em atmosfera de 86,5% Ar, 13,16% O<sub>2</sub>, 0,24% N<sub>2</sub> e 0,09% CO<sub>2</sub> para obtenção de evolução máxima de H<sub>2</sub> em função do tempo e incubações em atmosfera normal para avaliação da evolução em condições normais de fixação. Foi utilizado o modelo V de câmara. Frascos Erlenmeyers foram adaptados especialmente com saídas e coletores de gás (Figura 6a), que permitiram evacuação ou retirada de amostras para análise de H<sub>2</sub> por espectrometria de massa. A espectrometria de massa foi o primeiro método utilizado com sucesso para determinação de H<sub>2</sub> (HOCH *et alii*, 1957, e 1960; BERGERSEN, 1963, DIXON, 1967). Nesses frascos puderam ser medidos simultaneamente o N fixado (método <sup>15</sup>N) e a evolução de H<sub>2</sub>. O volume interno do frasco era de 78 ml. A introdução da mistura de gases contendo <sup>15</sup>N<sub>2</sub> era feita após se fazer vácuo no sistema. Determinações da composição gasosa foram feitas no início e no final das incubações, sendo as amostras analisadas em espectrômetro de massa, passando antes por "trap" de gelo seco em álcool. O espectrômetro de massa usado foi um ATLAS-Varian-MAT modelo CH-4 (DUCATTI *et alii*, 1974).

#### 4.2.3. Medida da razão C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>

*Método I* - Baseou-se na aplicação de todas as medidas em



uma mesma planta, sendo as mesmas aplicadas dentro da faixa de linearidade da redução de  $C_2H_2$ . Plantas inteiras de diferentes idades (duas repetições cada, num total de quatro plantas) foram incubadas na Câmara V (Figura 5) em atmosfera de  $^{15}N_2$  (67,25%  $^{15}N_2$  a 42% átomos  $^{15}N$  em excesso), 14%  $O_2$ , 18,3% Ar e 0,45%  $CO_2$ ) por 80 - 90 minutos. Nesse período, uma iluminação era mantida através de 4 baterias com 6 lâmpadas fluorescentes de 20 Watts cada e 3 lâmpadas incandescentes de 60 Watts. A temperatura era mantida ao redor de 30 - 33°C através de um condensador onde circulava água a 4°C (JOFFE e TIDMARSH, 1961; STEFANSON, 1970). Uma bomba elétrica mantinha em circulação a mistura gasosa durante a incubação (Figura 7). Após incubação, o gás era bombeado de volta ao cilindro por Bomba Toepler e as plantas eram decapitadas para o teste de redução de  $C_2H_2$  na Câmara I de 500 ml contendo 10%  $C_2H_2$  durante 1 hora.

Paralelamente ao experimento, plantas decapitadas de uma determinada idade foram incubadas por tempo semelhante na câmara IV, contendo a mesma mistura gasosa da câmara V para determinação do N fixado (método  $^{15}N$ ) e da evolução de  $H_2$  (Figura 7). Amostragens das composições gasosas foram feitas no início e no final da incubação, através da introdução direta de gás no espectrômetro de massa, passando antes por "trap" de gelo seco em álcool para retirada de vapores d'água.

Após a redução de  $C_2H_2$ , as amostras foram imediatamente congeladas para término da atividade dos nódulos. Determinou-se o peso e N total dos nódulos, raízes e parte aérea das plantas pelo método Kjeldahl. Através do método de Rittenberg, descrito por TRIVELIN *et alii* (1973), o N fixado pôde ser calculado, usando-se os valores de N total das diferentes

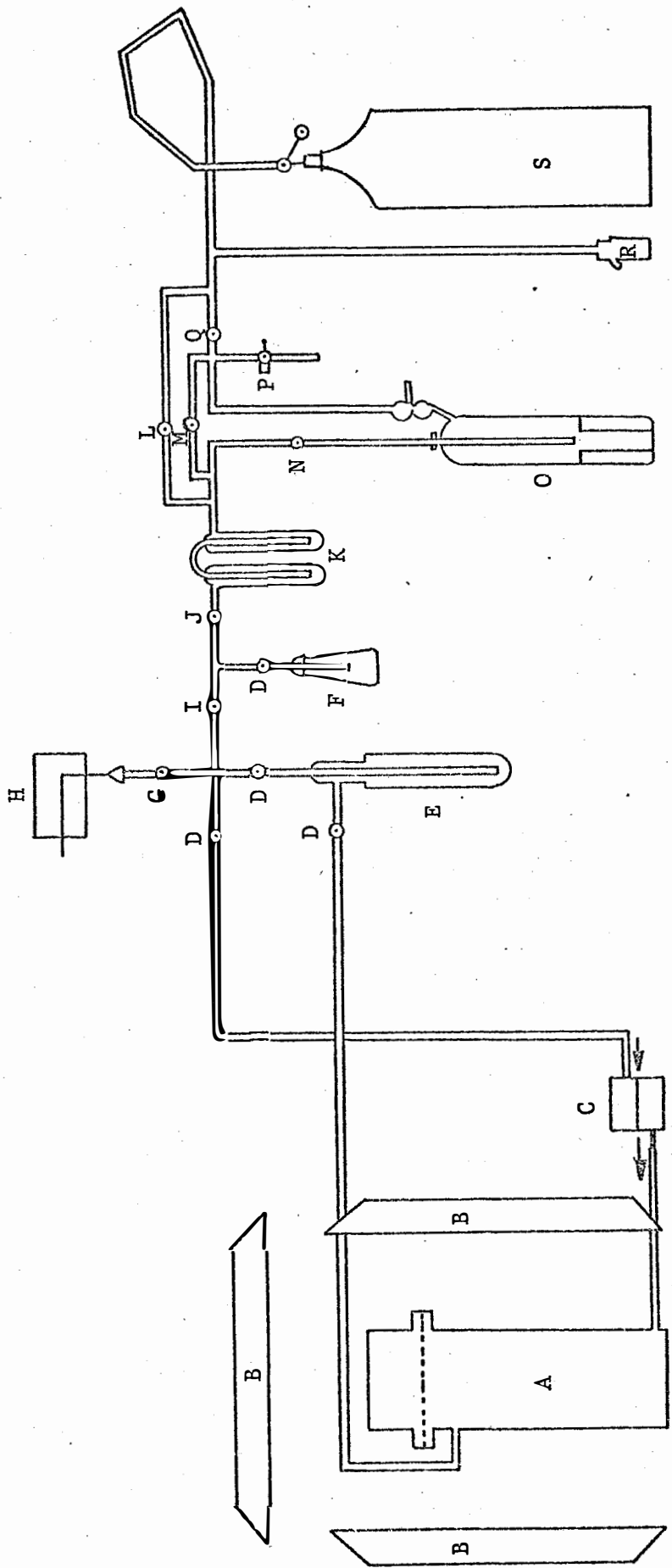


Figura-7. Sistema de incubação com <sup>15</sup>N<sub>2</sub>, em condições controladas de laboratório

- A. Câmara de Incubação IV
- B. Bateria de luz fria
- C. Bomba de circulação
- D. Torneira para retirada de amostras de gás das câmaras
- E. "Trap" para vapores d'água
- F. Câmara de Incubação V
- G. Torneira para retirada de amostra
- H. Medidor de Vácuo
- I e J. Torneiras

- K. "Traps" para vapores de Hg
- L e M. Torneiras para admissão de gás nas Câmaras (IV e V)
- N. Torneira da Bomba Toepler
- O. Bomba Toepler
- P. Torneira para vácuo
- Q. Torneira para entrada de gás
- R. Barômetro
- S. Cilindro contendo mistura de gás

frações das plantas, os átomos %  $^{15}\text{N}$  em excesso nas diferentes frações das plantas (nódulos, raízes e parte aérea) e no gás  $^{15}\text{N}_2$ . Plantas controles foram usadas para determinação da variação natural. Todas as medidas foram baseadas sobre peso de nódulos secos por unidade de tempo.

*Método II* - Testes independentes de  $^{15}\text{N}$  mais evolução de  $\text{H}_2$  e de redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  foram aplicados simultaneamente em diferentes plantas de feijão para estudos da razão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$ . As plantas foram mantidas nas mesmas condições de luz, umidade e temperatura. Para essas medidas, foram usados frascos de boca larga com 130 ml de volume. Tampas de borracha nº 13 foram perfuradas e vedadas com rolha de 5 mm de diâmetro para facilitar a introdução de gases ou retirada de amostras. Nestes frascos, podem ser incubadas facilmente duas plantas de cada idade (Figura 6b). Os testes foram realizados em três etapas, cada uma utilizando plantas de diferentes idades em três repetições (16, 20 e 27 dias de idade), totalizando 9 frascos para medida de  $^{15}\text{N}$  e  $\text{H}_2$  e 9 frascos para redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  por etapa. Os primeiros nove frascos eram parcialmente evacuados, sendo substituídos posteriormente por 30 - 40 ml de um gás puro de  $^{15}\text{N}_2$  a 96,4% e completados com 6 - 8 ml de  $\text{O}_2$  puro. A composição da mistura gasosa de cada frasco era imediatamente retirada e armazenada em um tubo de vidro de 6 mm de diâmetro e 25 cm de comprimento, vedadas com rolhas "serum cap" em ambas as extremidades e evacuadas um pouco antes por uma seringa hipodérmica (Figura 6c). Uma agulha de dupla saída para "vacutainer" conectava o tubo à câmara para retirada de amostra (volume ao redor de 1,5 ml). No final da incubação, foram feitas duas novas amostragens do gás de cada frasco. Através de seringa hipodérmica, foram adicionados 5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N para paralisar a atividade dos nódulos logo após a última amostragem de gás (BURRIS, 1972).

Paralelamente eram feitas as incubações com 10%  $C_2H_2$  em outras plantas de mesma idade. Todos os frascos foram incubados na própria câmara de crescimento a  $25^{\circ}C$ . Duas amostras de 0,5 ml eram retiradas de cada frasco para leitura no cromatógrafo.

Os tubos contendo os gases de cada frasco foram transferidos a tubos Rittenberg onde, após serem evacuados, foram quebrados e seus conteúdos transferidos para espectrômetro de massa para determinação da composição gasosa.

Análises de N total dos nódulos, raízes e parte aérea foram feitas pelo método Kjeldahl. O N fixado foi determinado do mesmo modo que no método I anteriormente descrito. Foram incluídas análises de variância nos cálculos.

#### 4.3. Cálculos de átomos (A) % $^{15}N$ em excesso; $N_2$ fixado, $C_2H_2$ reduzido, $H_2$ evoluído e razão $C_2H_2:N_2$

##### 4.3.1. Átomos (A) % $^{15}N$ em excesso (TRIVELIN *et alii*, 1975)

Utiliza-se da seguinte equação:

$$A\% \text{ } ^{15}N = \frac{100}{2R + 1}, \text{ sendo } R = \frac{^{14}N \text{ } ^{14}N}{^{14}N \text{ } ^{15}N} \text{ ou } \frac{I_{28}}{I_{29}}$$

$I_{28}$ ,  $I_{29}$  = intensidades dos picos 28 e 29 da amostra.

Sobre esses cálculos são feitas as correções para contaminação do ar, utilizando-se dos picos 28 e 32 ou 40 do ar atmosférico.

O valor de  $A\% \text{ } ^{15}\text{N}$  da amostra menos o  $A\% \text{ } ^{15}\text{N}$  do controle nos fornece os  $A\% \text{ } ^{15}\text{N}$  em excesso:

$$A\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ excesso amostra} = A\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ amostra} - A\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ controle}$$

#### 4.3.2. Medida da fixação de $\text{N}_2$

A quantidade de  $\text{N}_2$  fixado por um sistema fixador é calculada com a seguinte fórmula (BERGERSEN, 1973):

$$\text{N}_2 \text{ fixado } (\mu\text{moles}) = \frac{\text{N amostra } (\mu\text{moles}) \times A\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ excesso amostra}}{A\% \text{ } ^{15}\text{N} \text{ excesso na fase } \text{N}_2}$$

Pode-se calcular a taxa de fixação, dividindo-se a quantidade fixada pelo tempo de incubação. Considera-se em geral para as leguminosas, a fixação por peso unitário de nódulos secos (DÖBEREINER, 1966).

#### 4.3.3. Medida da redução de $\text{C}_2\text{H}_2$

É obtido da seguinte fórmula (van BERKUN, 1976):

$$\mu\text{moles } \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} = \left( \frac{x \cdot V_1}{t \cdot W_1} - \frac{y \cdot V_2}{W_2} \right) \text{ R. K. g nódulos}^{-1}$$

sendo:  $x = \text{pico (mm) } \text{C}_2\text{H}_4 \text{ amostra} = \text{Altura (mm)} \times \text{Atenuação}$

$y = \text{pico (mm) } \text{C}_2\text{H}_4 \text{ blank}$

$V_1 = \text{volume do frasco de incubação da amostra (ml)}$

$V_2 = \text{volume do frasco de incubação do blank (ml)}$

$W_1 = \text{volume de amostra injetado (ml)}$

$W_2 = \text{volume de blank injetado (ml)}$

t = tempo de incubação (h)

R = Range do cromatôgrafo

K = constante

K está relacionado com a calibração do cromatôgrafo para uma conhecida quantidade de  $C_2H_4$  (500 vpm).

Uma amostra de 0,5 ml de 500 vpm  $C_2H_4$  contém  $0,25 \times 10^{-3}$  ml  $C_2H_4$ . Em C.N.P.T., temos:

$$\begin{array}{r} 1 \text{ Mol } C_2H_4 \text{ ———— } 22400 \text{ ml ou cm}^3 \\ x \text{ ———— } 0,25 \times 10^{-3} \text{ ml} \end{array}$$

$$x = 11,16 \mu \text{ moles/amostra}$$

a  $25^\circ C$ , temos:

$$11,16 \times \frac{298^\circ K}{273^\circ K} \approx 12,18 \mu \text{ moles/amostra}$$

A mesma amostra de 0,5 ml de 500 vpm  $C_2H_4$  vai dar Z(mm) de pico, portanto:

$$K = \frac{12,18}{Z} = y \mu \text{ moles } C_2H_4/\text{mm},$$

sendo que  $Z(\text{mm}) = \text{Altura (mm)} \times \text{Atenuação} \times \text{Range}$

#### 4.3.4. Medida da evolução de $H_2$

A composição da amostra gasosa de incubação dos nódulos foi analisada por espectrômetro de massa. Os picos dos elementos foram medidos em mm, multiplicados pela voltagem da leitura e descontados os picos

do "back-ground" do aparelho.

Dependendo da concentração porcentual de cada componente molecular, o espectrômetro de massa pode medir os picos com maior ou menor precisão. Para cálculos da porcentagem real de cada componente, deve-se utilizar de fatores de correção, obtidos a partir de amostras de composição conhecida. Esses fatores foram anteriormente calculados por CAMARGO (1971), sendo que somente acrescentamos o fator para  $H_2$ :

$H_2$	.....	3,31
$N_2$	.....	0,980
$O_2$	.....	1,100
Ar	.....	0,950
$CO_2$	.....	0,995

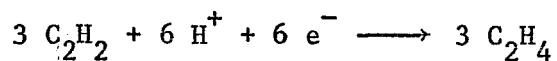
O fator para  $H_2$  foi obtido usando-se amostras contendo proporções iguais de  $N_2$  e  $H_2$ . A precisão da leitura do pico de massa 2 foi muito menor que para a massa 28, necessitando-se utilizar de um valor alto (3,31) para correção dos valores obtidos para  $H_2$ .

#### 4.3.5. Razão entre $C_2H_2$ , $N_2$ e $H_2$

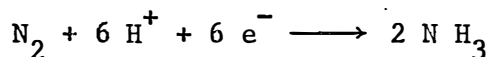
As taxas de redução de  $C_2H_2$ , fixação de  $^{15}N_2$  e evolução de  $H_2$  pelos nódulos sob idênticas condições foram empregadas para cálculo das razões entre  $C_2H_2$ ,  $N_2$  e  $H_2$ . Todos os valores foram expressos em  $\mu$  moles/g nódulos secos . h.

Se tanto o substrato ou fornecimento de energia e redutores não forem limitantes, a razão dos produtos para igual número de elétrons

transferidos deveria ser 1,5:1 de acordo com as reações (BERGERSEN, 1970):

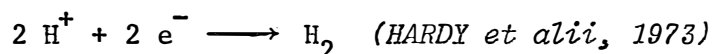


ou



Pode-se relacionar também entre nitrogênio e acetileno reduzidos  $\longrightarrow \text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$ , que fornece a razão teórica de 3:1 (HARDY *et alii*, 1968; 1973).

A evolução de  $\text{H}_2$  é representada pela seguinte reação:



O valor 3 para a razão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  só é válido para organismos eficientes, que não liberem  $\text{H}_2$ . Valores acima de 3 são encontrados principalmente em organismos que apresentam evolução de  $\text{H}_2$ . Neste caso, uma outra equação estequiométrica incluindo  $\text{H}_2$  evoluído, pode representar melhor o processo. Assumindo que todo o fluxo de eletrons para a nitrogenase é utilizado a uma taxa constante para redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  (processo de 2 eletrons), o total de eletrons empregados na redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  deve equivaler-se à soma de eletrons empregados na redução de  $\text{N}_2$  (processo de 6  $\text{e}^-$ ) e protons (processo de 2  $\text{e}^-$ ) a uma  $p\text{N}_2$  constante. A equação fica:

$$\frac{\dots\dots\dots \text{moles de } \text{C}_2\text{H}_4 \text{ produzido}}{3 \text{ (moles } \text{N}_2 \text{ fixado) + moles } \text{H}_2 \text{ evoluído}} = 1$$

(PETERS *et alii*, 1977).



## 5. RESULTADOS

### 5.1. Medidas da redução de $C_2H_2$

#### 5.1.1. Calibração da reta padrão de $C_2H_4$

Padrões de  $C_2H_2$  de 10, 100 e 1000 vpm foram preparados para observação da linearidade dos pontos de leitura nessa faixa de concentração. Foram feitas 7 leituras para cada padrão (Tabela 3, Figura 8). Medidas de concentrações maiores de  $C_2H_4$  apresentaram menores variações. A faixa ideal de trabalho do padrão para medidas de fixação em leguminosas está entre 100 a 1000 vpm de  $C_2H_4$ . Considerando isto, foram preparados novos padrões de 100, 300 e 500 vpm de  $C_2H_4$ , cada um com três repetições. Em cada padrão foram feitas 10 leituras e medidos os erros das leituras (s), os erros das médias de cada concentração ( $\bar{s}$ ) ao nível de 95% de probabilidade. Os coeficientes de variação das leituras dos padrões foram em média 2,25%, 1,35% e 1,83% respectivamente para 100, 300 e 500 vpm (Tabela 4, Figura 9). As variações entre os três padrões de 500 vpm foram menores (2,06%), podendo ser atribuído nesse caso, um erro de até 4% (ao nível de 95% de probabilidade) devido às variações das medidas de um padrão de 500 vpm de  $C_2H_4$ .

Tabela 3. Determinação da reta padrão usando padrões de 10, 100 e 1000 vpm de  $C_2H_4$ , totalizando 7 leituras por padrão. As médias de cada padrão estão acompanhadas pelos seus erros padrões ( $\bar{s}$ ) a 95% de probabilidade.

Amostras	Leituras de padrões de $C_2H_4$ (mm)		
	10 vpm	100 vpm	1000 vpm
1	28,5	304	2784
2	28,5	306	2776
3	26,0	304	2784
4	26,0	308	2832
5	26,0	308	2816
6	27,5	308	2816
7	27,0	308	2824
Média $\pm \bar{s}$	27,07 $\pm$ 1,05	306,57 $\pm$ 1,76	2804,57 $\pm$ 20,89
C.V.	4,17%	0,62%	0,80%

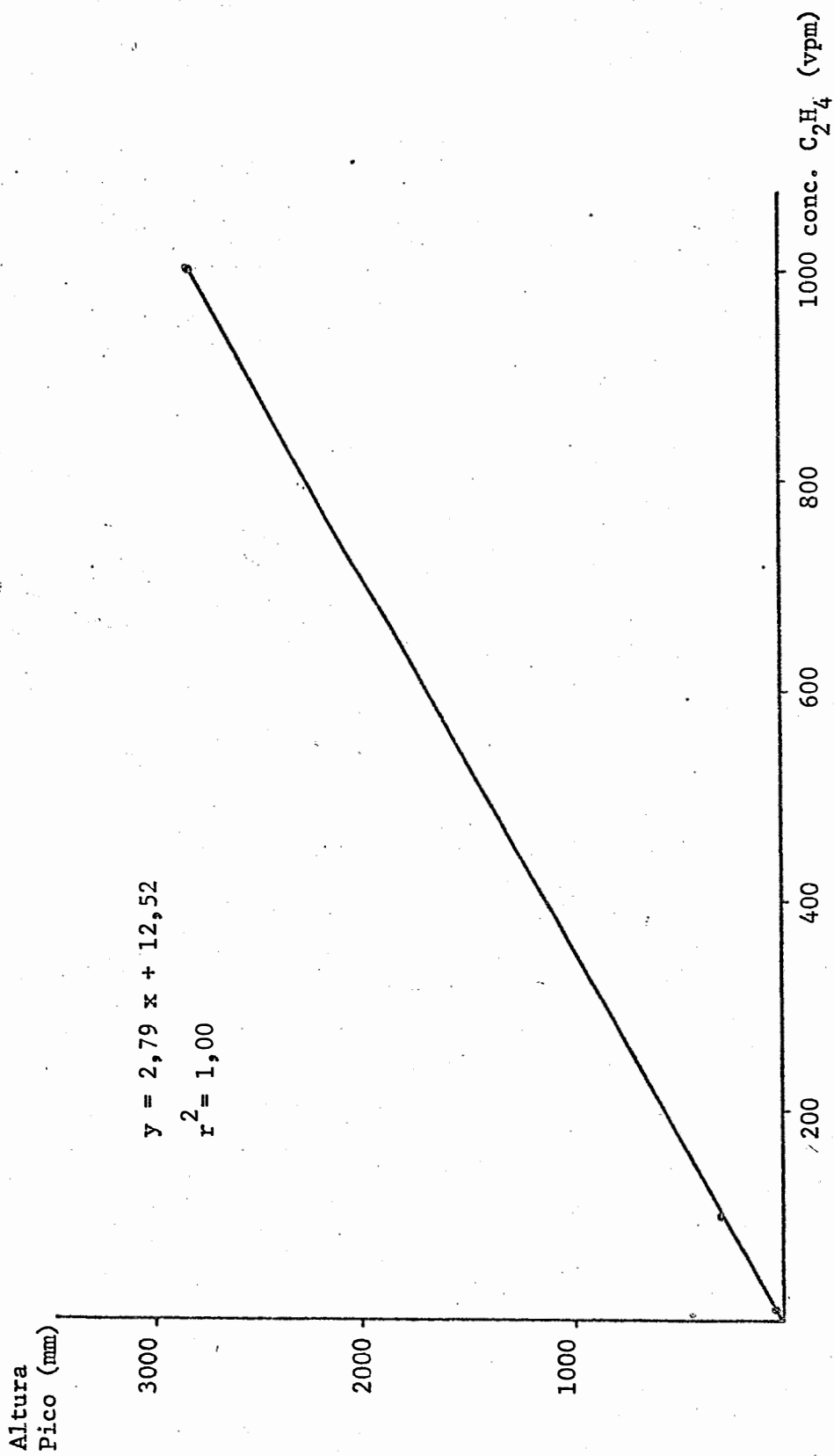


Figura 8. Reta padrão de  $C_2H_4$ , obtida através de injeções de amostras contendo diferentes concentrações de  $C_2H_4$  (10, 100 e 1000 vpm), cada ponto representando a média de 7 leituras.

Tabela 4. Determinação da reta padrão usando padrões de 100, 300 e 500 vpm de  $C_2H_4$ . Os valores representam médias de 10 leituras por padrão  $\pm$  desvio padrão (s), sendo que no final estão calculadas as médias de três padrões  $\pm$  erro padrão da média ( $\bar{s}$ ) a 95% de probabilidade (Intervalo de Confiança).

Amostras (Padrões)	Leituras de padrões de $C_2H_4$ (mm)					
	100 vpm		300 vpm		500 vpm	
	média $\pm$ s	C.V.	média $\pm$ s	C.V.	média $\pm$ s	C.V.
1	380,40 $\pm$ 5,80	1,52%	1123,20 $\pm$ 19,67	1,75%	1861,82 $\pm$ 26,07	1,40%
2	357,60 $\pm$ 8,47	2,37%	1115,20 $\pm$ 10,12	0,91%	1884,80 $\pm$ 21,06	1,12%
3	388,40 $\pm$ 11,07	2,85%	1012,00 $\pm$ 14,24	1,41%	1852,80 $\pm$ 55,32	2,98%
Média $\pm$ $\bar{s}$	375,47 $\pm$ 5,95		1083,47 $\pm$ 19,94		1867,20 $\pm$ 14,35	
C.V.	4,25%		4,94%		2,06%	

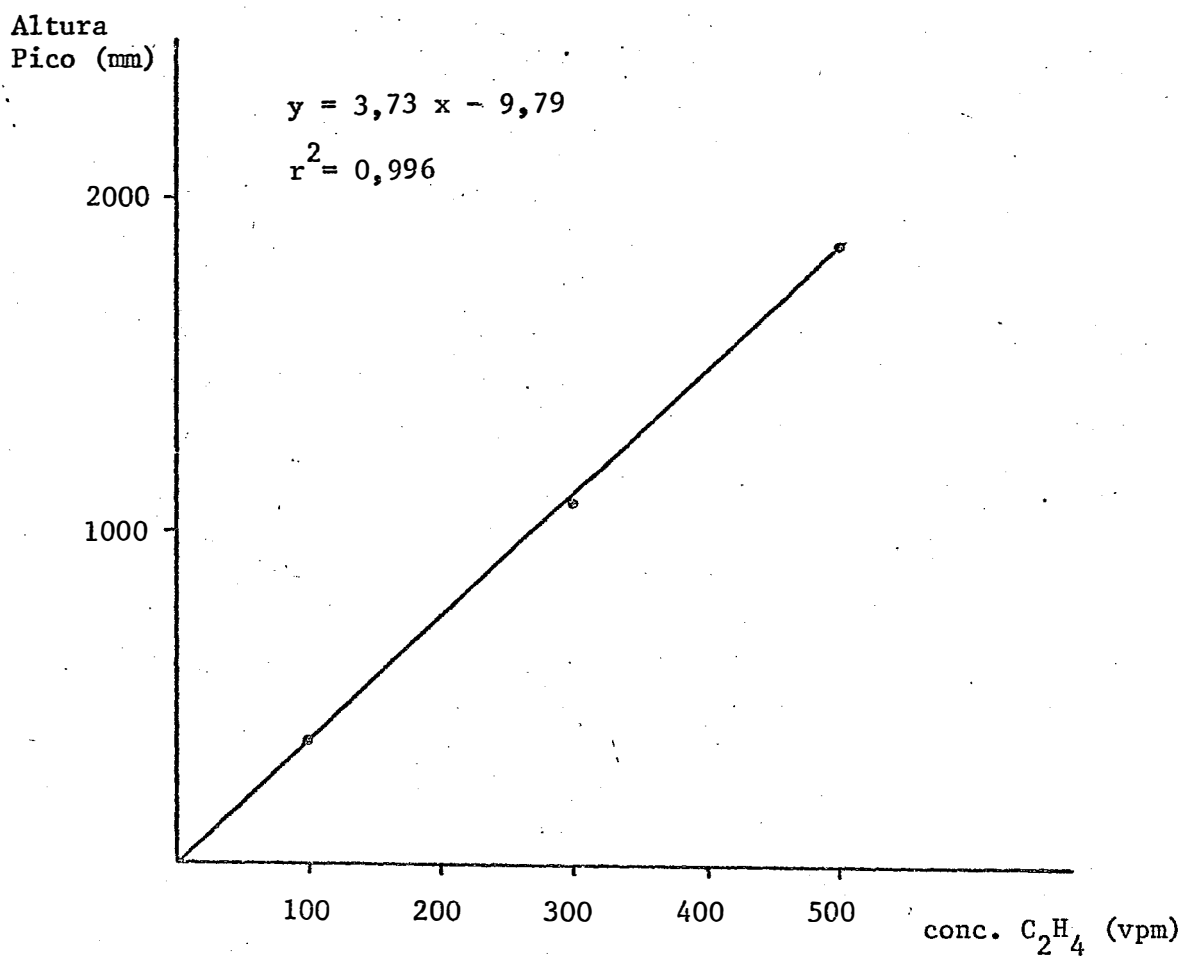


Figura 9. Reta padrão de  $C_2H_4$ , determinada por leituras de diferentes concentrações de  $C_2H_4$  (100, 300 e 500 vpm). Cada ponto representa a média de três padrões de mesma concentração, tendo sido feito para cada padrão uma média de 10 leituras.

## 5.1.2. Fontes de erro nas medidas de redução de $C_2H_2$ em laboratório

### 5.1.2.1. Seringas

O método da redução de acetileno, quando aplicado em experimentos com muitas análises, necessita do uso de muitas seringas. Neste caso, seringas plásticas descartáveis de 1 ml podem ser utilizadas, ao invés das seringas Hamilton, próprias para cromatografia de gás. Desde que se conheçam as variações devidas ao uso das seringas plásticas, elas podem perfeitamente ser usadas para este fim. Apesar dessas seringas não possuírem a mesma precisão que as seringas Hamilton, pode-se compensar tomando-se maior volume de gás nas seringas plásticas. Neste caso, o erro das medidas para a seringa plástica fica em torno de 4,06% e o da seringa Hamilton em torno de 3,02% (Tabelas 5a, 5b).

Problemas de entupimento na agulha ao se injetar a amostra no cromatógrafo podem trazer erros. Quando o septo do orifício para injeção de amostras é novo, este fato é mais frequente, mas pode-se diminuir a ocorrência de entupimentos com o estreitamento da ponta da agulha de modo a diminuir o orifício da mesma, deixando-o ao mesmo tempo em posição mais lateral.

### 5.1.2.2. Erros do operador

Os cuidados do operador devem ser maiores nas leituras das seringas plásticas; variações na ordem de 2 - 6% podem ocorrer devido ao uso de diferentes seringas (Tabela 6a).

Tabela 5a. Erro da seringa Hamilton na medida de 100  $\mu$ l de padrão de 500 vpm  $C_2H_4$ , atenuação 16, range 100.

<u>Leitura</u>	<u>Pico</u> (mm)
1	304
2	320
3	320
4	304
5	304
6	298
Média $\pm$ s	308,33 $\pm$ 9,33
C.V.	3,02%

Tabela 5b. Erro das seringas plásticas na medida de 0,5 ml de padrão de 500 vpm  $C_2H_4$ , atenuação 16, range 100.

<u>Seringas</u>	<u>Pico</u> (mm)
1	1276
2	1280
3	1224
4	1180
5	1272
6	1328
Média $\pm$ s	1260,00 $\pm$ 51,22
C.V.	4,06%

Para diminuir o coeficiente de variação, pode-se tomar maiores volumes de gás (Tabela 6b). Não se recomenda, porém, o uso de volumes acima de 0,5 - 1,0 ml, para não danificar a coluna do cromatógrafo. Amostras com alta concentração de  $C_2H_4$  podem ser medidas com volumes menores, preferivelmente em seringas Hamilton (de 50 - 100  $\mu$ l).

### 5.1.2.3. Armazenamento das amostras

O armazenamento do gás em seringas plásticas por longo tempo pode acarretar em vazamento, porque a borracha do êmbolo da seringa não tem capacidade para manter suficiente pressão por tempo indeterminado. O vazamento é considerável após 2 horas de armazenamento, como pode ser visto pela Tabela 7. Após 24 horas, o gás retido não pode mais representar a amostra. As leituras na primeira hora (0 - 1 hora após amostragem) apresentam variações dentro do esperado para essas seringas, mas após esse período, as variações crescem devido ao tempo de armazenamento.

### 5.1.3. Linearidade da redução de $C_2H_2$ em função do tempo de incubação

Os testes foram feitos em diferentes sistemas de plantas: raízes noduladas, plantas inteiras perturbadas e plantas intactas, para estudar as possíveis diferenças entre as medidas nos diversos sistemas. Em todos os testes, cuidou-se para que as plantas fossem incubadas logo após a retirada da parte aérea. O intervalo máximo entre preparo de amostra e incubação foi de 5 - 10 minutos. Para obter uma relação estequiométrica entre  $C_2H_2$  reduzido e  $N_2$  fixado, utilizou-se sempre da concentração saturante de 0,1 atm de  $C_2H_2$ .



Tabela 6a. Erro do operador usando seringas plásticas e injetando 0,5 ml de padrão de 500 vpm  $C_2H_4$ , atenuação 16, range 100.

	<u>Seringa 1</u>	<u>Seringa 2</u>	<u>Seringa 3</u>
	1328	1120	1200
	1280	1160	1232
	1152	1192	1184
	1216	1184	1224
	1180	1160	1248
	1300	1120	1224
Média ± s	1242,67 ± 70,46	1156,00 ± 30,67	1218,67 ± 23,00
C.V.	5,67%	2,65%	1,89%
Média ± s	1205,78 ± 57,50		
C.V.	4,76%		

Tabela 6b. Variações das leituras de amostras de diferentes volumes de padrão de 100 vpm  $C_2H_4$ , tomadas na mesma seringa plástica, na atenuação 2 e range 100.

Leitura	Volume		
	0,1 ml	0,5 ml	1,0 ml
1	53	188	444
2	53	195	440
3	55	204	438
4	56	192	437
5	50	200	438
Média ± s	53,40 ± 2,30	195,80 ± 6,34	439,40 ± 2,79
C.V.	4,31%	3,24%	0,63%

Tabela 7. Vazamento das seringas plásticas contendo 0,5 ml de padrão de 500 vpm  $C_2H_4$  em função do tempo de armazenamento. Altura dos picos em mm, atenuação 2, range 100.

Amostragem 1	Período de armazenameto			
	0 h	1 h		
	1296	1040		
	1392	1120		
	1312	1088		
Média ± s	1333,33±51,43	1082,67±40,27		
C.V.	3,86%	3,72%		
Amostragem 2	Período de armazenameto			
	0 h	1 h	2 h	
	1328	1256	984	
	1280	1120	1200	
	1272	1336	984	
Média ± s	1293,33±30,29	1237,33±109,20	1056,00±124,71	
C.V.	2,34%	8,82%	11,81%	
Amostragem 3	Período de armazenameto			
	0 h	1 h	2 h	24 h
	1760	1792	1696	48
	1880	1664	1568	880
	1904	1744	1466	1376
	1888	1712	1680	896
	1808	1456	1696	1232
	1904	1760	1312	1328
	1872	1680	1440	496
Média ± s	1860,57±55,21	1686,86±111,18	1551,14±150,36	893,71±484,64
C.V.	2,97%	6,59%	9,69%	54,23%

### 5.1.3.1. Raízes noduladas de plantas de diferentes idades

A redução de  $C_2H_2$  em raízes noduladas apresenta uma fase linear até 2 horas após incubação (Tabela 8, Figura 10). Plantas mais novas, apresentando atividades de nitrogenase mais altas, podem reduzir linearmente  $C_2H_2$  por mais tempo, desde que não ocorram alterações excessivas na transpiração, que possam acelerar o consumo de carboidratos e privar mais rapidamente os nódulos de energia (HUANG *et alii*, 1975; MAHON, 1977 a e b).

### 5.1.3.2. Raízes noduladas vs plantas inteiras perturbadas

Observou-se que nódulos de plantas decapitadas podem fixar linearmente por um período maior que plantas noduladas inteiras. Supõe-se que a transpiração seja o fator limitante neste caso, desviando a energia utilizada para redução de  $C_2H_2$  (MAHON, 1977a). Um exemplo dessa natureza foi observado, incubando-se plantas inteiras perturbadas e raízes noduladas a diferentes temperaturas. A  $28^{\circ}C$ , a produção de  $C_2H_4$  é maior porém variações maiores são obtidas em plantas inteiras em relação às plantas in cubadas a  $24^{\circ}C$  (Tabela 9a e 9b). No final do teste a  $28^{\circ}C$  (após 3 horas), as plantas que estavam inteiras apresentaram aspecto de deficiência de água (murchamento das folhas).

As raízes noduladas mantiveram a linearidade da redução de  $C_2H_2$  por um período maior, porém os resultados são mais variáveis, com coeeficientes de variação mais altos (Figuras 11 e 12) em torno de 25% (a  $24^{\circ}C$ ) e 36% (a  $28^{\circ}C$ ). As atividades específicas de 230-260  $\mu$  moles  $C_2H_4/g$  nod.h de nódulos com 21 - 24 dias de idade estão de acordo com as obtidas por GRAHAM e HALLIDAY (1977). Neste caso, mantendo-se boas as condições de in

Tabela 8. Linearidade da redução de  $C_2H_4$  em função do tempo de incubação. Medidas feitas em raízes noduladas de plantas de diferentes idades, com médias de cada tempo de leitura  $\pm$  desvio padrão (s).

Idade Amostras (Plantas)	$C_2H_4$ formado ( $\mu$ moles $C_2H_4/g$ nódulos secos)							
	20'	40'	60'	80'	100'	120'	140'	180'
1'	50,954	95,778	131,790	183,893	231,399	288,099	288,099	254,856
2	58,075	109,513	152,654	209,070	243,915	273,782	285,397	308,179
3	65,512	135,621	185,426	205,347	272,775	294,283	312,618	329,267
Médias	58,180 $\pm$ 7,28	113,637 $\pm$ 20,24	156,623 $\pm$ 27,04	199,436 $\pm$ 13,59	249,363 $\pm$ 21,22	285,388 $\pm$ 10,52	295,371 $\pm$ 15,00	297,434 $\pm$ 38,35
C.V.	12,51%	17,81%	17,26%	6,81%	8,51%	3,69%	5,08%	12,89%
41 dias	31,783	54,898	67,419	110,760	126,170	138,690	150,248	152,132
2	29,092	45,794	71,115	80,806	105,595	109,905	127,145	129,739
Médias	30,438 $\pm$ 1,90	50,346 $\pm$ 6,44	69,267 $\pm$ 2,61	95,785 $\pm$ 21,18	115,882 $\pm$ 14,55	124,298 $\pm$ 20,35	138,696 $\pm$ 16,34	140,936 $\pm$ 15,83
C.V.	6,24%	12,79%	3,76%	22,11%	12,55%	16,37%	11,78%	11,23%

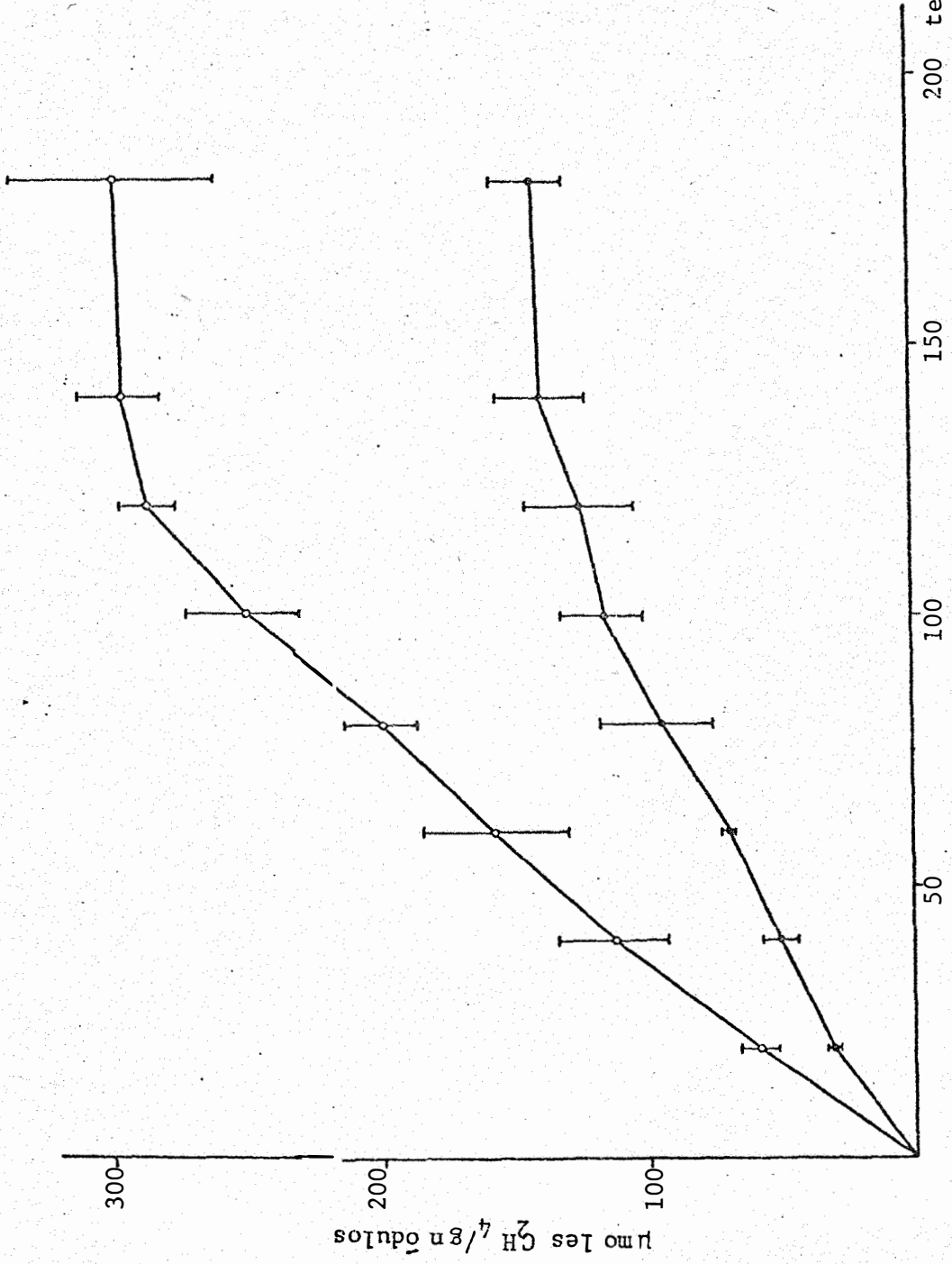


Figura 10. Redução de  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$  por raízes noduladas de feijão de 31 (○) e 41 dias (●) de idade em função do tempo de incubação. Cada ponto representa a média de 2-3 amostras individuais, usando a Câmara I de incubação a  $25^\circ C$ . As barras verticais representam os desvios padrões das médias (s).

Tabela 9a. Redução de  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$  de raízes noduladas e plantas inteiras perturbadas de 21 dias de idade, incubadas nas câmaras II a  $24^{\circ}C$ . As médias das 6 amostras de cada sistema estão acompanhadas pelos seus desvios padrões (s) e coeficientes de variação (C.V.).

	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> formado		(μ moles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /g nódulos secos)		
	20'	40'	60'	90'	120'
<b>Plantas Inteiras</b>					
1	105,60	180,88	224,95	337,52	352,05
2	96,75	165,93	211,98	263,16	326,24
3	108,00	168,27	208,47	215,04	269,68
4	95,39	163,37	214,90	225,87	293,85
5	96,31	152,84	211,09	274,78	300,10
6	83,78	147,01	172,05	225,91	250,05
Médias ± s	97,64 ± 8,61	163,05 ± 11,96	207,24 ± 18,16	257,05 ± 45,90	298,66 ± 36,98
C.V.	8,82%	7,34%	8,76%	17,86%	12,52%
<b>Raízes Noduladas</b>					
1	125,59	220,17	332,58	457,00	507,00
2	103,24	204,20	325,30	401,43	484,49
3	56,10	103,43	218,64	238,77	258,91
4	81,38	132,25	212,88	260,88	320,66
5	86,69	138,60	231,17	308,30	381,43
6	99,82	156,33	285,25	366,01	474,70
Médias ± s	92,14 ± 23,43	159,16 ± 44,75	267,64 ± 54,00	338,73 ± 84,43	404,53 ± 100,59
C.V.	25,43%	28,12%	20,18%	24,92%	24,87%

Tabela 9b. Redução de  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$  de raízes noduladas e plantas inteiras perturbadas de 24 dias de idade, incubadas nas câmaras II a 28°C. As médias das 4 amostras de cada sistema estão acompanhadas pelos seus desvios padrões (s) e coeficientes de variação (C.V.).

Plantas Inteiras	$C_2H_4$ formado ( $\mu$ moles $C_2H_4$ /g nódulos secos)				
	Tempo de incubação				
	20'	40'	60'	80'	120'
1	107,03	216,12	292,28	288,16	368,44
2	78,62	153,41	242,38	245,98	358,97
3	61,61	134,92	212,28	255,45	331,01
4	49,56	89,69	141,62	151,06	237,20
Médias	74,21±24,92	148,54±52,41	222,14±63,01	235,16±58,91	323,91±59,95
C.V.	33,58%	35,28%	28,36%	25,05%	18,50%
					15,79%
Raízes Noduladas	$C_2H_4$ formado ( $\mu$ moles $C_2H_4$ /g nódulos secos)				
	20'	40'	60'	80'	120'
1	86,40	175,01	236,31	275,40	328,70
2	66,97	126,58	259,29	346,54	367,44
3	47,52	118,13	143,92	186,02	228,11
4	116,79	231,73	294,26	364,15	472,66
Médias	79,42±29,54	162,86±52,31	233,45±64,26	293,03±81,00	349,23±101,09
C.V.	37,19%	32,12%	27,53%	27,64%	28,95%
					27,70%

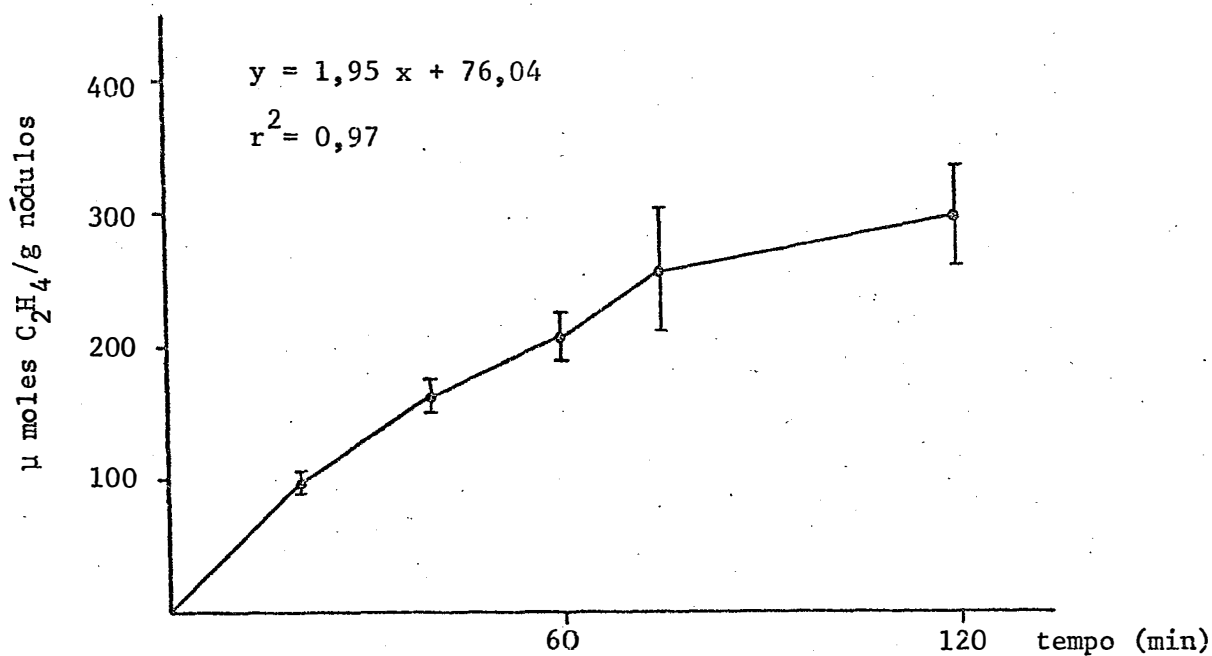
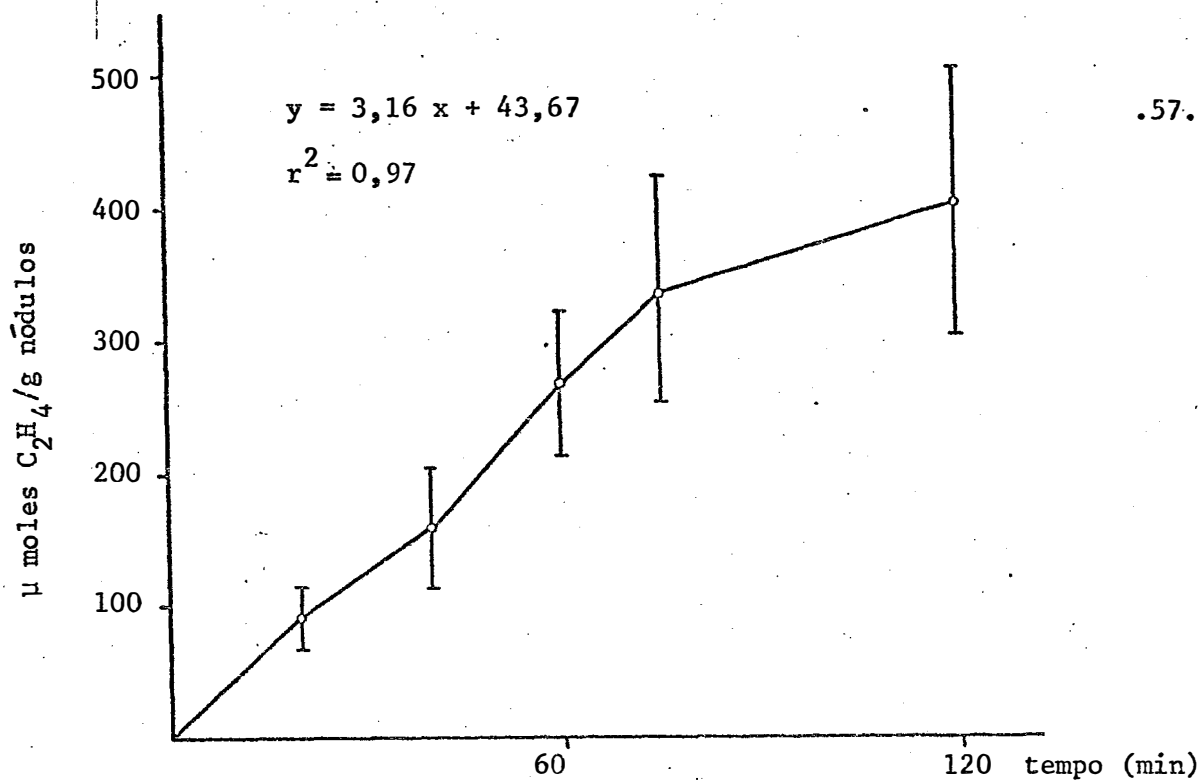


Figura 11. Redução de  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$  de raízes noduladas (o—o) vs plantas noduladas perturbadas (◐—◐), em função do tempo de incubação. Cada ponto representa a média de 6 plantas com 21 dias de idade, usando a Câmara II de incubação a  $24^\circ C$ . As barras verticais em cada ponto representam o desvio padrão das médias (s).



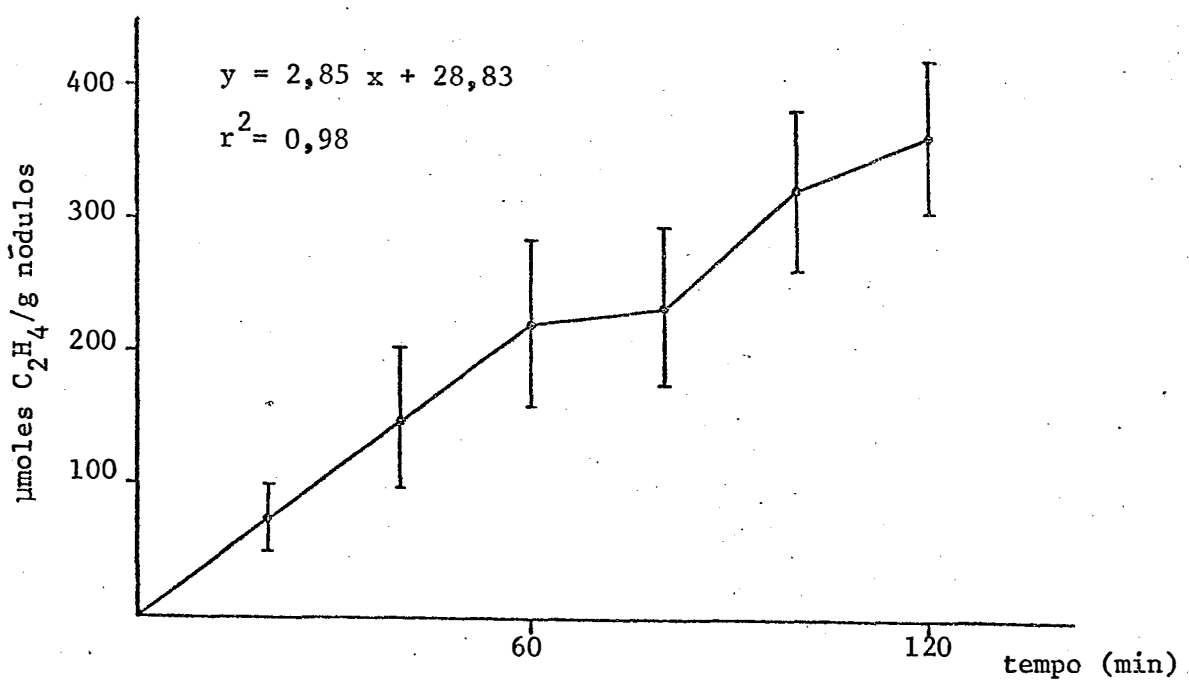
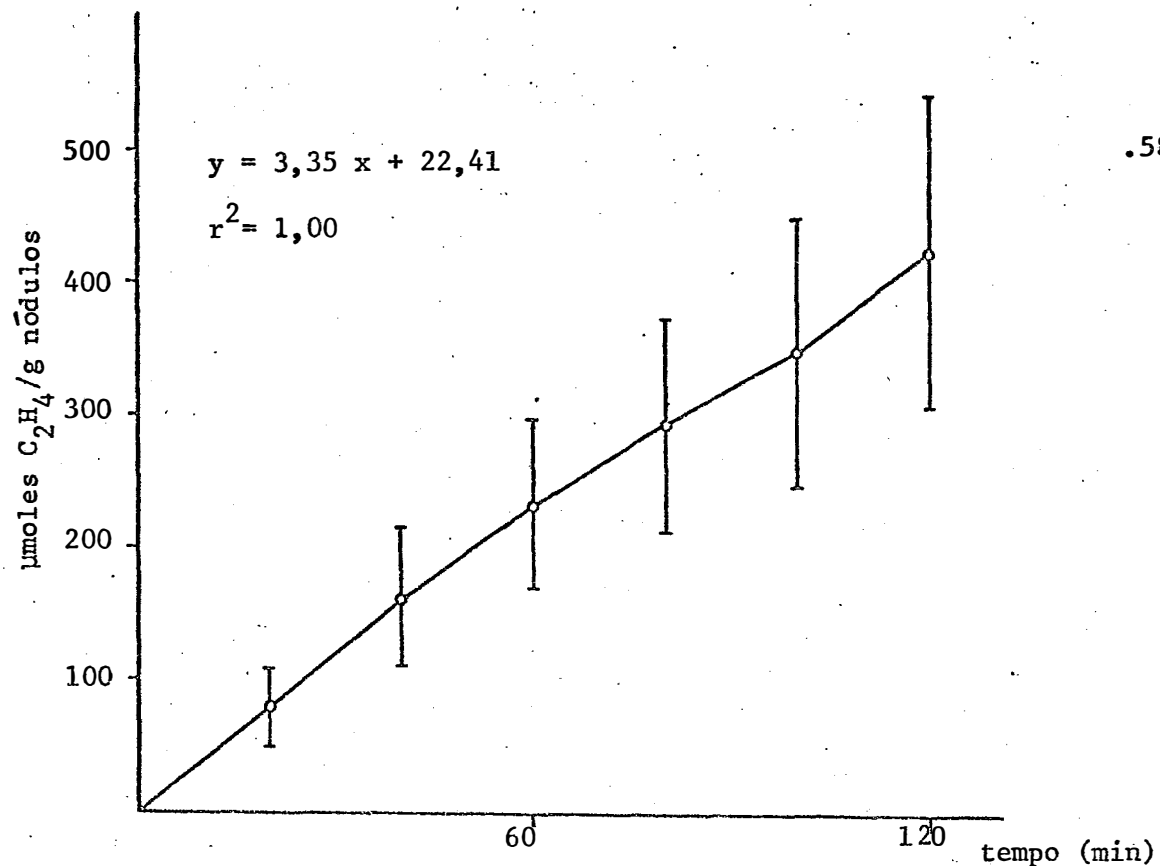


Figura 12. Redução de  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$  de raízes noduladas (o—o) vs plantas noduladas perturbadas (•—•), em função do tempo de incubação. Cada ponto representa a média de 4 plantas com 24 dias de idade, usando a Câmara II de incubação a 28°C. As barras verticais de cada ponto representam o desvio padrão das médias (s).

cubação, pode-se estender o período linear de redução por até 2 horas. Se semelhantes resultados também foram obtidos por *MAGUE e BURRIS (1972)*, em nó dulos de soja.

### 5.1.3.3. Raízes noduladas vs plantas noduladas intactas

Medidas de redução de  $C_2H_2$  em plantas noduladas intactas fo ram comparadas com reduções por raízes noduladas em casa de vegetação (Ta-  
bela 10), a fim de estabelecer possíveis diferenças entre reduções de  $C_2H_2$  por sistemas condicionados "in situ" (plantas intactas em solo) e sistemas "in vivo" (raízes noduladas). A maioria dos testes utilizam sistemas "in vivo" pela facilidade da medida, mas medidas em condições naturais ("in si tu") são, em última análise, mais conclusivas e definitivas.

A média das atividades em plantas intactas foi ligeiramente superior à obtida em raízes noduladas, porém as variações altas entre as amostras não permitem concluir que essa diferença é devida aos diferentes tratamentos. As raízes noduladas apresentaram atividade média de  $173,12 \pm 55,63$ , com coeficiente de variação de 32% e as plantas intactas uma atividade média de  $188,14 \pm 43,19$  e uma variação menor entre os dados (23%). Tanto o efeito do corte da parte aérea da planta ("decapitação") quanto uso de segmentos de raízes noduladas prejudicam a atividade dos nó dulos, podem ser significativos à medida que se aumenta o tempo de incubação.

Em períodos curtos de incubação (30-60 minutos), as ativida des de nó dulos de plantas intactas quanto raízes noduladas podem ser consi deradas iguais. Esses dados, apesar de não significativos, de certa forma acompanham os resultados obtidos por *MAGUE e BURRIS (1972)*, que encontra-

Tabela 10. Teste incubando plantas com 45 dias de idade em tubo de ensaio (câmara III) em casa de vegetação, numa faixa de temperatura de 18 a 22°C durante o período de amostragem (9 - 11 horas da manhã), com 30 minutos de incubação.

Amostra	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> formado (μ moles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /g nódulos . h)	
	sistema intacto (Plantas Intactas)	sistema perturbado (Raízes noduladas)
1	179,18	268,67
2	133,37	224,11
3	172,91	153,39
4	248,18	161,33
5	198,00	144,00
6	234,68	99,61
7	199,50	108,72
8	235,62	227,09
9	101,93	225,14
10	212,27	165,48
11	184,30	198,04
12	157,68	101,81
Média ±	188,14 ± 43,19	173,12 ± 55,63
C.V.	22,96%	32,13%

ram uma proporção de 100/46/23 na taxa de redução de  $C_2H_2$  entre plantas intactas, raízes noduladas e nódulos destacados de soja.

## 5.2. Evolução de $H_2$

### 5.2.1. Em atmosfera $Ar/O_2$

A evolução de  $H_2$  foi detectada por espectrometria de massa em nódulos ativos de feijão com mais de 20 dias de idade. Sob baixa  $pN_2$  (0,2%  $N_2$ ), a evolução de  $H_2$  é alta, como pode ser observada pela Tabela 11a, correspondendo em média a 50  $\mu$  moles  $H_2/g$  nódulos.h. Em outro teste (Tabela 11b), a evolução de  $H_2$  foi menor, podendo este fato ter sido influenciado tanto pela presença de maior concentração de  $N_2$  (10-12%  $N_2$ ) quanto pela menor idade dos nódulos. O efeito de  $N_2$  na evolução de  $H_2$  foi observado por outros pesquisadores (BERGERSEN, 1962; PETERS *et alii*, 1977). Para expressar o efeito inibidor de uma determinada  $pN_2$  na produção de  $H_2$ , PETERS *et alii* (1977) designaram a média dos valores de  $H_2$  produzidos pela associação *Azolla-Anabaena* em atmosfera de Ar, num dado intervalo de tempo, como 100% e obtiveram uma diminuição de 75% e 85%, respectivamente em 0,29 e 0,60 atm de  $N_2$ . Comparando-se as Tabelas 11a com as Tabelas 11b e 11c, notamos diferenças nas produções de  $H_2$ , que podem ter sido causadas tanto pelas diferentes  $pN_2$  usadas, quanto pelas idades diferentes dos nódulos. A linearidade da evolução de  $H_2$  foi observada, incubando-se nódulos de 25 dias por 2 horas (Tabela 11c e Figura 13). Durante este período, os nódulos mantêm taxa quase constante de evolução de  $H_2$ .

Tabela 11a. Evolução de  $H_2$  em nódulos de feijão de 28 dias sob atmosfera Ar/ $O_2$  (86,50% Ar, 13,16%  $O_2$ , 0,24%  $N_2$  e 0,09%  $CO_2$ ), a  $26,5^\circ C$  (Câmara V de incubação) em função do tempo de incubação.

Componente Massa	Composição da mistura gasosa (%)		
	Início (0:00h)	t = 2:20h	t = 3:22h
2 ( $H_2$ )	-	1,031	1,068
28 ( $N_2$ )	0,24	0,575	0,806
32 ( $O_2$ )	13,16	8,122	7,706
40 (Ar)	86,50	84,440	83,833
44 ( $CO_2$ )	0,09	5,831	6,587
$\mu$ moles $H_2/g$ nód.	-	113,71	117,79

Tabela 11b. Evolução de  $H_2$  em nódulos de 25 dias de idade sob atmosfera Ar/ $O_2$ , a  $26,5^\circ C$  (Câmara V).

Componente Massa	Composição da mistura gasosa (%) após 1 h incubação	
	Amostra 1	Amostra 2
2 ( $H_2$ )	0,139	0,280
28 ( $N_2$ )	11,545	10,394
32 ( $O_2$ )	12,166	9,602
40 (Ar)	73,308	74,307
44 ( $CO_2$ )	2,841	5,417
$\mu$ moles $H_2/g$ nód.	15,94	12,97

Tabela 11c. Evolução de  $H_2$  em função do tempo de incubação em nódulos de 25 dias de idade sob atmosfera Ar/ $O_2$ , a  $26,5^\circ C$  (Câmara V).

Componente Massa	Composição da mistura gasosa (%)					
	Amostra 1		Amostra 2		Amostra 3	
	60'	120'	60'	120'	60'	120'
2 ( $H_2$ )	0,093	0,254	0,053	0,182	0,064	0,208
28 ( $N_2$ )	5,815	11,208	5,494	6,616	7,287	11,080
32 ( $O_2$ )	12,860	11,703	12,912	11,955	12,810	11,040
40 (Ar)	79,088	73,276	79,477	78,216	77,446	74,985
44 ( $CO_2$ )	2,144	3,558	2,063	3,031	2,392	2,687
$\mu$ moles $H_2/g$ nódulos	5,19	14,18	5,68	19,49	4,54	14,76

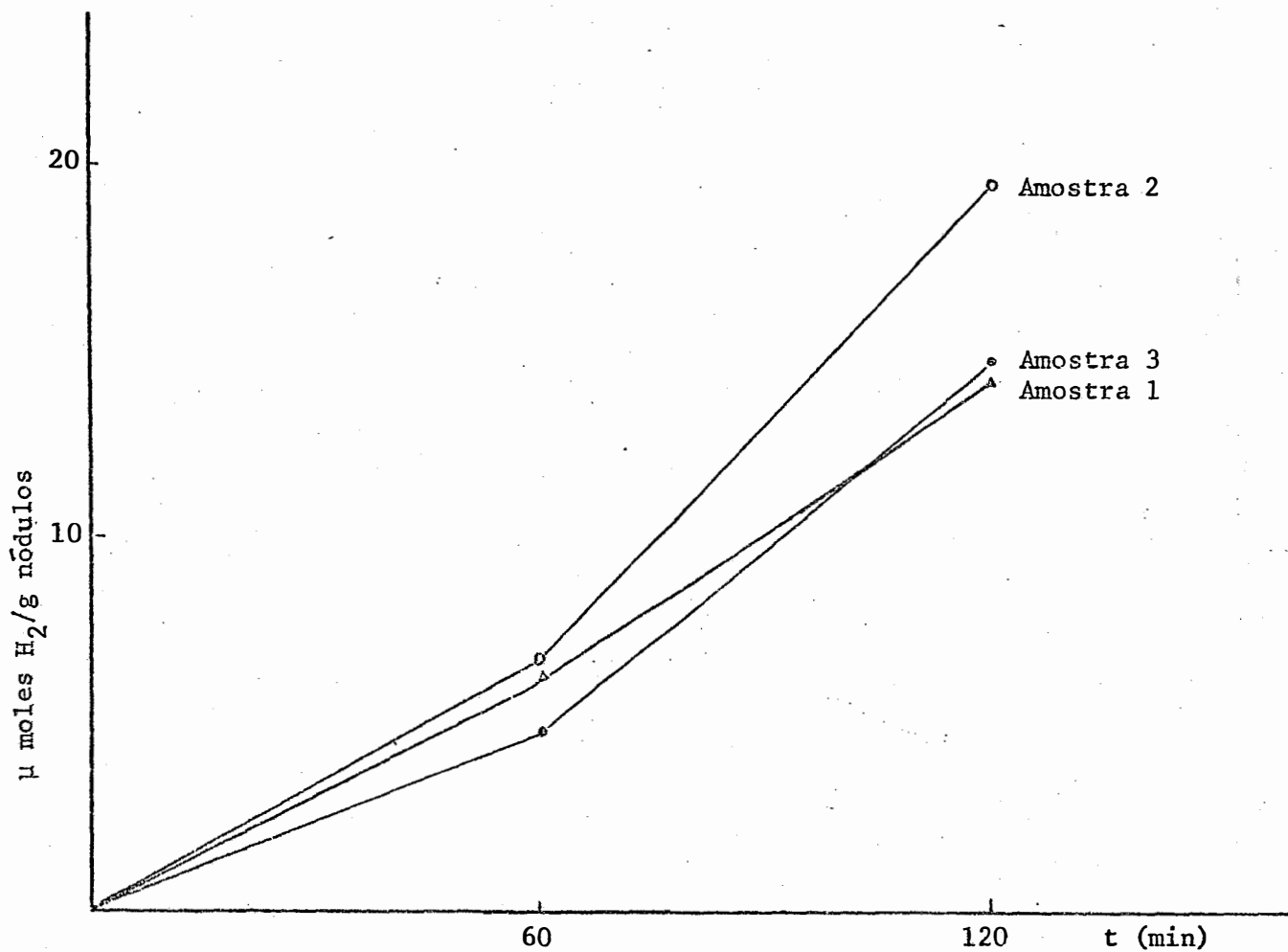


Figura 13. Evolução de H<sub>2</sub> em nódulos de 25 dias de idade e baixa pN<sub>2</sub>, em função do tempo de incubação.

### 5.2.2. Em ar

Quantidades crescentes de nódulos de mesma idade foram incubadas na Câmara VI (Tabela 12) para determinação da linearidade da evolução de  $H_2$  em relação ao peso de nódulos. Quantidades de 2 - 3 g de nódulos frescos podem ser utilizadas em frascos de 120 ml, correspondendo em média a 0,5 g de material seco. A linearidade da evolução é observada usando-se até 0,5-0,6 g de nódulos secos por frasco de 120 ml (Figura 14).

Estudando-se a evolução (em ar) de  $H_2$  em nódulos de 34 dias (Tabela 13), pôde-se detectar em média uma evolução de  $7,65 \pm 4,64 \mu$  moles  $H_2/g$  nod. h (C.V. 60,65%), valor este considerado baixo. Esses nódulos, quando condicionados a um ambiente ("fitotron") com temperatura constantemente alta, têm vida ativa intensa, porém, mais curta.

## 5.3. Medida das razões $C_2H_2:N_2$ reduzidos

### 5.3.1. Método I - Nas mesmas plantas

A utilização do Método I teve por finalidade de relacionar os parâmetros de fixação em um mesmo sistema fixador. As condições experimentais para determinação dos parâmetros de fixação e redução de  $C_2H_2$  foram semelhantes para todas as plantas, que permaneceram inalteradas durante o tempo de incubação.

Inicialmente, determinou-se a variação natural existente em nódulos, raízes e parte aérea de plantas de feijão cultivadas nas condições do experimento. O erro experimental para análises de fixação por es-

Tabela 12. Evolução de  $H_2$  em ar em nódulos de plantas de 31 dias, desenvolvidas em vermiculita e areia em casa de vegetação, a uma faixa de temperatura do ar entre 15 - 35°C. Medida da evolução de  $H_2$  em função do peso de nódulos/hora.

Nódulos		Evolução de $H_2$ em ar
Peso mat. fresca (g)	Peso mat. seca (g)	$\mu$ moles $H_2$ /h
1,010	0,2285	10,140
2,566	0,4656	24,638
2,759	0,5245	29,460
3,974	0,8040	35,078



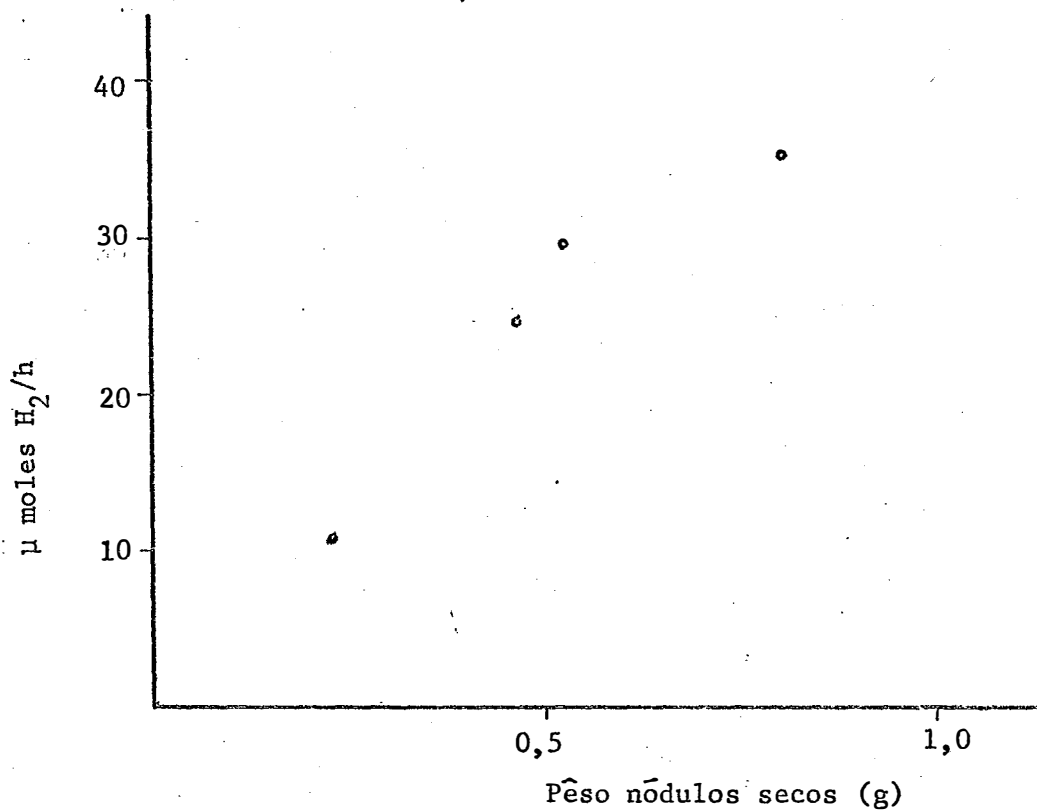


Figura 14. Evolução de H<sub>2</sub> relacionada com peso de nódulos, incubados nas câmaras VI em atmosfera normal, com 32 dias de idade.

Tabela 13. Evolução de  $H_2$  em ar em nódulos de 34 dias de idade, nas câmaras VI, a  $25^\circ C$  por um período de 1 hora de incubação.

Componente Massa	Composição da mistura gasosa após 1 h de incubação (%)					Médias
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	
2 ( $H_2$ )	0,007	0,006	0,010	0,008	0,008	
28 ( $N_2$ )	79,175	79,179	78,853	78,904	79,223	
32 ( $O_2$ )	18,365	18,366	18,666	17,507	18,400	
40 (Ar)	1,329	1,324	1,335	1,334	1,339	
44 ( $CO_2$ )	1,124	1,125	1,136	2,247	1,031	
$\mu$ moles $H_2$ / g nod.	5,84	3,98	15,55	5,05	7,86	$7,65 \pm 4,64$

C.V. 60,65%

pectrometria de massa foi calculada em 0,005 átomos %  $^{15}\text{N}$  em excesso (Tabela 14).

Nesse teste, cada amostra era composta de duas plantas. Maior variabilidade foi observada nos testes de redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$ , podendo-se atribuir em parte à natureza da medida de  $\text{C}_2\text{H}_4$  - um gás, ou porque o  $\text{C}_2\text{H}_2$  foi aplicado uma hora após o início do experimento, depois dos testes de  $^{15}\text{N}_2$  e  $\text{H}_2$ . Essa grande variabilidade na redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  também foi observada por outros autores (*ROUGHLEY e DART, 1969; BERGERSEN, 1970*). Variações acima de 5 - 6% podem ser atribuídas às plantas e não a erros experimentais na medida de  $\text{C}_2\text{H}_4$  em laboratório, devidos às seringas, aos erros do operador ou armazenamento das amostras.

Os dados obtidos por esse método demonstraram que o aumento em átomos %  $^{15}\text{N}$  em excesso estava diretamente relacionado com a atividade específica dos nódulos (redução  $\text{C}_2\text{H}_2$ ) e inversamente com a idade dos mesmos (Tabela 15). Após uma hora, já ocorreu incorporação significativa do N fixado simbioticamente nas raízes e folhas. As medidas de fixação de  $^{15}\text{N}_2$  foram mais consistentes e menos variáveis que as de redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$ .

As razões  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  em nódulos mais novos (13 - 20 dias) variaram entre 3,0 - 5,4. Um aumento na razão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  em função da idade dos nódulos foi observado neste experimento. Isto pode ser devido à evolução de  $\text{H}_2$ , que foi possível ser detectada na faixa de idade acima de 20 dias. *BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1977a, b)* detectaram evolução de  $\text{H}_2$  em nódulos de feijoeiro e ervilhas somente com mais de 4 semanas de idade, tendo a evolução máxima ocorrido 5 semanas após plantio. Neste caso, um balanço eletrônico, incluindo medidas de  $\text{H}_2$  em nódulos de 29-35 dias de ida-

Tabela 14. Variação natural em  $^{15}\text{N}$  (átomos %  $^{15}\text{N}$ ) das plantas de feijoeiro com 21 dias de idade, usadas como controle.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média $\pm$ s
Nódulos	0,360	0,363	0,363	0,362 $\pm$ 0,002
Raízes	0,359	0,364	0,361	0,361 $\pm$ 0,003
Folhas	0,358	0,363	0,361	0,361 $\pm$ 0,003
Média $\pm$ s	0,361 $\pm$ 0,002			
Média $\pm$ $\bar{s}$ *	0,361 $\pm$ 0,005			

\* = Erro padrão da média a 95% probabilidade

Tabela 15. Fixação da  $^{15}\text{N}_2$ , evolução de  $\text{H}_2$  e redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$  em nódulos de *Phaseolus vulgaris* L. pelo Método I. Razão  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  e balanço eletrônico  $\text{C}_2\text{H}_4/(\text{N}_2 + \text{H}_2)$  em nódulos de diferentes idades. As incubações foram feitas em 0,66 atm  $\text{N}_2$  (a 42,36 e 42,84% de enriquecimento em  $^{15}\text{N}^*$ ), 14%  $\text{O}_2$  e 0,45%  $\text{CO}_2$ , em ar e 0,1 atm  $\text{C}_2\text{H}_2$ , respectivamente para os três testes.

Amostra (nódulos)	Idade (dias)	Peso mat. seca (g)	t( $^{15}\text{N}_2$ ) min	A% $^{15}\text{N}$ (A% $^{15}\text{N}$ cor.-0,362)	N total (mg N)	N <sub>2</sub> fixado		H <sub>2</sub> evoluido $\mu\text{moles H}_2/\text{g nod. h}$	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> reduzido $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{g nod. h}$	Ef. Relativa	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> / (3N <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> )			
						nódulos (raízes) (P. aérea) ( $\mu\text{g N}$ )	Total N ( $\mu\text{moles N}_2/\text{g nod. h}$ )								
1	13	0,0860	80	0,286	11,541	77,714	5,686	127,966	4,57	39,85	-	176,04	-	4,42	-
2	13	0,0620	80	0,288	11,817	80,128	3,150	114,928	4,10	49,60	-	267,23	-	5,39	-
3	20	0,1600	80	0,244	13,280	76,291	9,648	162,654	5,81	26,23	-	79,80	-	2,93	-
4	20	0,1100	80	0,212	14,575	72,750	4,109	105,339	3,76	25,63	-	112,18	-	4,38	-
5	29	0,1357	80	0,105	15,063	37,238	1,308	38,546	1,38	7,63	-	86,74	0,69	11,37	1,75
6	29	0,1684	80	0,118	15,375	42,715	1,014	43,729	1,56	6,94	-	78,50	0,66	11,51	1,65
7	35	0,3714	90	0,130	16,787	51,970	5,288	118,409	4,23	7,59	-	62,63	0,73	8,25	1,57

\* Fase  $^{15}\text{N}_2$  das amostras 1 a 6 a 42,473% átomos  $^{15}\text{N}$  em excesso

Fase  $^{15}\text{N}_2$  da amostra 7 a 41,992% átomos  $^{15}\text{N}$  em excesso

+ não detectado

de, pode representar melhor a relação entre essas três medidas. Apesar das medidas de  $H_2$  não constituírem de dados de mesmas plantas, os mesmos foram obtidos de incubações realizadas paralelamente às de  $^{15}N_2$ , usando nódulos de mesmas idades. O efeito da evolução de  $H_2$  na razão  $C_2H_2:N_2$  e no balanço eletrônico é mais aparente à medida que a idade dos nódulos aumenta. O ponto de máxima evolução parece ocorrer 4 - 5 semanas após o plantio, indicada pela alta razão  $C_2H_2:N_2$  nesse período.

### 5.3.2. Método II - Em diferentes plantas

Foram realizados dois experimentos pelo Método II. Os dados de fixação de  $N_2$  e evolução de  $H_2$  foram obtidos de nódulos de mesmas plantas, enquanto que os dados de redução de  $C_2H_2$  foram obtidos de diferentes plantas (Tabelas 16 e 17). No primeiro experimento, as razões  $C_2H_2:N_2$  e o balanço eletrônico  $C_2H_4/(3N_2 + H_2)$  de nódulos de diferentes idades representaram as médias de 7 - 8 dados cada e no segundo, foram usadas 5 repetições com nódulos de 37 dias de idade.

Foi novamente observada uma relação direta entre átomos %  $^{15}N$  em excesso com a atividade ( $C_2H_2$  formado) e inversa com a idade dos nódulos.

Nódulos mais novos são mais ativos (atividade específica), apresentando as menores variações em redução de  $C_2H_2$  e evolução de  $H_2$  (Tabelas 16 e 17).

Os valores de N fixado foram mais consistentes e apresentaram menor variabilidade, o que é uma característica da medida. Mesmo uti-

Tabela 16. Medidas do N fixado, evolução de H<sub>2</sub> em ar e redução de acetileno (10% v:v C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) em raízes noduladas de *Phaseolus vulgaris* L. Razão C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> e balanço eletrônico C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(3N<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>) pelo Método II, usando as Câmaras VI de incubação.

Idade (dias)	Amostra	Peso mat. seca (g)	t( <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ) min	A% <sup>15</sup> N excesso (A% <sup>15</sup> N cor.-0,362)	A% <sup>15</sup> N <sub>2</sub> excesso	N total (mg)	N <sub>2</sub> fixado		H <sub>2</sub> evoluído em ar μmoles H <sub>2</sub> /g nod.h	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> reduzido μmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /g nod.h	Ef. Relativa C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> :N <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /(3N <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> )
							nódulos (raízes) μg N	N Total μmoles N <sub>2</sub> /g nod.h				
	1	0,0482	62	0,107	8,351	2,772	35,517	10,010	45,527	32,65	279,66	
	2	0,0501	60	0,186	20,994	3,113	27,580	18,685	46,265	32,98	286,42	
	3	0,0497	62	0,305	20,840	2,714	39,720	16,040	55,760	38,78	214,62	8,25 ± 0,07
21-22	4	0,0500	62	0,248	21,865	2,890	32,779	27,624	60,403	41,75	201,15	1,43 ± 0,14
	5	0,0464	60	0,166	25,565	2,775	18,019	8,909	26,928	20,73	257,36	C.V. 0,85%
	6	0,0493	60	0,187	29,347	2,933	18,689	8,145	26,834	19,44	279,68	C.V. 9,79%
	7	0,0520	60	0,235	35,777	2,954	19,403	10,326	29,729	20,42	186,44	
Média ± s											243,62 ± 41,90	0,66
C.V.											17,20%	
	1	0,0471	70	0,128	17,926	2,374	16,951	12,380	29,331	19,06	160,95	
	2	0,0673	68	0,173	21,452	3,621	29,202	15,740	44,942	21,04	166,06	
	3	0,0708	65	0,164	21,484	3,703	28,267	20,756	49,023	22,83	87,00	7,92 ± 0,11
25-26	4	0,0461	63	0,141	26,971	2,572	13,446	8,098	21,544	15,90	129,32	1,43 ± 0,13
	5	0,0553	60	0,136	27,085	3,080	15,465	3,214	18,679	12,06	138,74	C.V. 1,39%
	6	0,0634	60	0,125	25,113	3,601	17,924	3,967	21,891	12,33	122,72	
	7	0,0787	60	0,247	28,975	4,014	34,218	6,434	40,652	18,45	116,01	
	8	0,0690	60	0,231	34,251	3,491	23,544	4,695	28,239	14,62	158,68	
Média ± s											134,94 ± 26,89	0,68
C.V.											19,92%	
	1	0,0658	64	0,052	21,315	3,290	8,026	5,730	13,756	7,00	33,61	
	2	0,0701	64	0,105	20,941	3,540	17,750	8,223	25,973	12,41	21,47	
	3	0,1361	62	0,056	21,807	5,594	14,365	5,206	19,571	4,97	77,47	7,38 ± 0,40
32-33	4	0,0761	67	0,085	26,838	4,109	13,014	3,402	16,416	6,90	21,23	1,32 ± 0,28
	5	0,0685	62	0,054	27,671	3,391	6,618	0,886	7,504	3,79	55,74	C.V. 5,42%
	6	0,0700	60	0,084	27,494	2,856	8,726	1,379	10,105	5,16	89,51	
	7	0,1016	60	0,083	24,262	5,212	17,830	1,672	19,502	6,86	51,10	
	8	0,1200	60	0,063	33,644	8,292	15,527	2,820	18,347	5,46	37,72	
Média ± s											48,48 ± 25,05	0,65
C.V.											47,43%	

Tabela 17. Medidas do N fixado, evolução de H<sub>2</sub> em ar e redução de acetileno (10% v:v C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) em raízes noduladas de *Phaseolus vulgaris* L. de 37 dias. Razão C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> e balanço eletrônico C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/(3N<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>) pelo Método II, usando as câmaras VI de incubação.

Amostra	Peso nódulos (g)	t( <sup>15</sup> N <sub>2</sub> ) min	N <sub>2</sub> fixado			H <sub>2</sub> evoluído em ar						
			A% <sup>15</sup> N excesso (A% <sup>15</sup> N cor.-0,362)	A% <sup>15</sup> N <sub>2</sub> excesso	N total (mg)	Nódulos (raízes) (µg N)	Total N (µg N)	µmoles N <sub>2</sub> /g nod.h	% H <sub>2</sub>	µmoles H <sub>2</sub> /g nod.h		
1	0,3002	65	0,027	14,575	16,211	30,031	6,486	36,517	112,285	4,01	0,055	11,19
2	0,3543	60	0,009	18,125	20,868	10,362	3,857	14,219	40,133	1,43	0,012	1,97
3	0,2526	60	0,009	18,055	13,009	6,485	2,642	9,127	36,152	1,29	0,026	6,09
4	0,3564	62	0,052	14,385	13,543	30,127	7,123	37,250	101,146	3,61	0,066	11,13
5	0,2888	62	0,023	18,635	21,111	26,056	5,654	31,710	106,257	3,79	0,044	9,01
Média ± s										2,83 ± 1,35		7,88 ± 3,90
C.V.										47,70%		49,49%

Amostra	Peso nódulos (g)	t(C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ) min	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> reduzido		Ef. Relativa (%)	C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> : N <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /(3 N <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> )
			µmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /amostra.h	µmoles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /g nod.h			
1	0,2800	60	2,595	9,27			
2	0,2646	60	3,681	13,91			
3	0,3129	60	12,730	40,63	0,65	7,91 ± 0,23	1,37 ± 0,45
4	0,2985	60	10,621	35,58		C.V. 2,91%	C.V. 32,85%
5	0,2313	60	2,877	12,44			
Média ± s				22,58 ± 14,59			
C.V.				65,19%			



lizando  $^{15}\text{N}_2$  a um enriquecimento um pouco mais baixo que o utilizado pela maioria dos outros trabalhos, pôde-se determinar o N fixado com variações menores que os valores obtidos pela redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$ . *VICTÓRIA* (1975) mediu a fixação de  $\text{N}_2$  em nódulos de feijoeiro usando  $^{15}\text{N}_2$  a concentrações mais baixas que as utilizadas no presente trabalho, obtendo valores significativos de N fixado.

Enquanto que as razões  $\text{C}_2\text{H}_2:\text{N}_2$  em nódulos de plantas inteiras variaram com a idade (3,0 a 11,4), as razões obtidas em raízes noduladas mantiveram-se mais constantes, a valores relativamente altos (entre 7,4 a 8,3). Valores semelhantes foram também obtidos por *BERGERSEN* (1970), usando nódulos de soja.

Em todas as idades de nódulos utilizados no Método II, foi possível detectar evolução de  $\text{H}_2$ , que serviu como fator decisivo no balanço de eletrons para obtenção de uma relação mais calibrada entre as três medidas - N fixado, evolução de  $\text{H}_2$  e redução de  $\text{C}_2\text{H}_2$ .

O balanço eletrônico  $\text{C}_2\text{H}_4/(3\text{N}_2 + \text{H}_2)$  aplicado nas medidas obtidas pelo Método II proporcionou valores ao redor de 1,32 a 1,43.

A idade ideal dos nódulos para avaliação da fixação em condições controladas esteve entre a faixa de 20 - 30 dias após a inoculação.

## 6. DISCUSSÃO

Numerosos trabalhos em fixação simbiótica de  $N_2$  têm utilizado a técnica da redução de  $C_2H_2$  para medida (indireta) da fixação de  $N_2$  (HARDY *et alii*, 1973 e 1977; CRISWELL *et alii*, 1976). Verificou-se pelo presente trabalho, que os erros experimentais da técnica em laboratório estão concentrados principalmente no uso de seringas plásticas inadequadas, no tempo de armazenamento de amostras para cromatografia, a não padronização da temperatura da incubação e do tempo de incubação. Pode-se minimizar esses erros até a ordem de 2 - 6%.

Recentemente, comprovou-se evolução de  $H_2$  dependente de ATP em nódulos de leguminosas e bactérias, sendo ela quase totalmente inibida em presença de  $C_2H_2$  (SCHUBERT e EVANS, 1976; SMITH *et alii*, 1976). Esses dados sugerem que a redução de  $C_2H_2$  pode superestimar a atividade da nitrogenase através da inibição da evolução de  $H_2$  dependente de ATP pelo  $C_2H_2$  (SCHUBERT e EVANS, 1976). Além disso, valores muito superiores a 3,0 foram muitas vezes encontrados em leguminosas (BERGERSEN, 1970; MacRAE, 1975; SINCLAIR, 1976).

BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1977 a, b) demonstraram recentemente evolução de  $H_2$  em nódulos de *Phaseolus vulgaris* e *Pisum sativum*. Provavelmente, a evolução de  $H_2$  também teria sido responsável pelo valor 4,75, ao invés de 3,0 da razão  $C_2H_2:N_2$ , obtido por MacRAE (1975) em nódulos destacados de *P. vulgaris*. Esse valor poderia ter sido até maior, uma vez que o autor expressou que as condições sub-ótimas de luz foram responsáveis pela baixa atividade dos nódulos.

À luz desses recentes dados, diversos autores sugeriram a necessidade de uma revisão geral das medidas de fixação e mostraram a importância de se medir pelo menos uma vez os três parâmetros de medida da fixação de  $N_2$ : fixação de  $^{15}N_2$ , redução de  $C_2H_2$  e evolução de  $H_2$  (BURRIS, 1972; 1974a; PETERS et alii, 1977).

No presente trabalho, foram utilizados dois métodos para determinação da razão  $C_2H_2:N_2$  e do balanço eletrônico  $C_2H_2/(3N_2 + H_2)$ . Conhecendo-se as diferentes limitações do Método I (teste em mesmas plantas - tempo de incubação e uso de câmaras adequadas para incubações em condições naturais, o método tem como maior restrição o perigo da generalização dos dados, uma vez que eles são obtidos de amostras que podem às vezes não representar todo o tratamento. Nestes casos, a escolha adequada de amostras homogêneas é essencial. Baseando-se nestas restrições, foi elaborado um segundo método (Método II), que serviu para minimizar os efeitos da escolha de prováveis amostras não representativas. Utilizando-se de amostras homogêneas escolhidas ao acaso, tanto os resultados de fixação de  $N_2$  e  $H_2$  quanto de redução de  $C_2H_2$  devem exprimir pelo menos em parte, o que ocorre em cada amostra particular. Neste caso, é possível generalizar.

Estudando diferentes sistemas-raízes noduladas, plantas inteiras perturbadas ou intactas constatou-se não haver diferenças significativas na redução de  $C_2H_2$  por estes sistemas, na primeira hora de medida. Desse modo, consideramos representativas as medidas obtidas em raízes noduladas e comparáveis com as de plantas intactas.

No Método I, as razões  $C_2H_2:N_2$  obtidas de nódulos de plantas inteiras variaram com a idade (3,0 a 11,4), numa relação direta. Neste caso, a evolução de  $H_2$  influenciou indiretamente no aumento da razão acima de 3,0.

As razões obtidas em raízes noduladas (Método II) mantiveram-se constantes, de 7,4 a 8,0. Razões  $C_2H_2:N_2$  acima de 3,0 podem indicar presumivelmente evolução de  $H_2$ . A medida da evolução de  $H_2$  foi importante para obtenção de uma relação mais calibrada entre fixação de  $^{15}N_2$ , evolução de  $H_2$  e redução de  $C_2H_2$ .

A eficiência relativa da estirpe de *R. phaseoli* usada - 127-K17 (Nitragin Co., EUA) foi calculada ao redor de 0,65 (Tabelas 14, 15 e 16), através da fórmula:

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ evoluído (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}} \quad (\text{SCHUBERT e EVANS, 1976})$$

o que está de acordo com os dados de eficiência relativa obtidos por BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1977b), usando a mesma estirpe. Os dados de eficiência do presente trabalho também estão próximos aos obtidos por SCHUBERT e EVANS (1976), estudando diversas leguminosas.

Segundo *PETERS et alii* (1977), valores baixos de  $C_2H_2:N_2$  de vem corresponder a altas eficiências e *vice-versa*. Valores abaixo de 3,0 dificilmente podem ser obtidos (a não ser que ocorram erros experimentais) mesmo em organismos altamente eficientes. No caso das leguminosas, cuja média é de 3,9, valores entre 1,5 - 8,5 podem facilmente ser obtidos em amostras semelhantes (*HARDY et alii*, 1973). No caso do feijoeiro, *RUSCHEL e RUSCHEL* (1973) obtiveram a razão 2 para  $C_2H_2:N_2$ , sendo o N fixado avalia do pelo Método Kjeldahl. Já MacRae, analisando o N fixado em nódulos de feijoeiro por espectrometria de emissão ótica obteve o valor 4,75.

Todas as razões  $C_2H_2:N_2$  acima de 3,0 podem indicar evolução de  $H_2$  e não significar obrigatoriamente uma medida inadequada da redução de  $C_2H_2$ . Exemplos dessa natureza foram obtidos por muitos pesquisadores (*BERGERSEN*, 1970; *HARDY et alii*, 1973; *GIBSON*, 1974; *MacRAE*, 1975). Teoricamente, seria difícil obter razões menores de 5 para a maioria das leguminosas que apresentam evolução de  $H_2$  (*PETERS et alii*, 1977).

O balanço eletrônico  $C_2H_4/(3N_2 + H_2)$  aplicado nas medidas obtidas pelo Método II proporcionou valores ao redor de 1,32 a 1,43. Esta razão alta sugere que a medida indireta da redução de  $C_2H_2$  está superestimando a fixação real de  $N_2$ , uma vez que a evolução de  $H_2$  foi também inclui da neste balanço. Pelos dados de ER (eficiência relativa) dos nódulos, ve rificamos que os mesmos estão de acordo com as de outros autores (*SCHUBERT e EVANS*, 1976; *BETHLENFALVAY e PHILLIPS*, 1977b), indicando uma proporção correta entre  $H_2$  e  $C_2H_4$  evuluidos. Além disso, as medidas de  $C_2H_4$  estão de certo modo em concordância com aquelas obtidas por *GRAHAM e HALLIDAY* (1977), ao redor de 130 - 250  $\mu$  moles  $C_2H_4$ /g nódulos secos . h para máximas

atividades em nódulos de feijoeiro. O que pode ter ocorrido foi uma maior taxa de redução de  $C_2H_2$  do que redução de  $N_2$ , uma vez que os dois substratos têm Km diferentes em relação à nitrogenase (BERGERSEN, 1970; RIVERA-ORTIZ, 1975).

Analisando os nossos dados e comparando-os com os obtidos por outros autores, sugerimos que pode ter ocorrido uma superestimativa da fixação de  $N_2$  ao redor de 32 - 43%, através da redução de  $C_2H_2$ . Nestas variações, estamos incluindo eventuais erros experimentais referentes às análises de N total (Kjeldahl) na ordem de 5% para os valores de  $N_2$  fixado.

A idade ideal dos nódulos para avaliação da fixação em condições controladas esteve entre a faixa de 20 - 30 dias após a inoculação.

Precauções especiais devem ser tomadas ao se utilizar o valor 3 para conversão teórica. Segundo BURRIS (1974a) e PETERS et alii (1977), a menos que os sistemas estejam em condições idênticas e sob  $pN_2$  aproximadamente ao do ar, somente assim é possível se fazer quaisquer comparações em fixação de  $N_2$ .

## 7. CONCLUSÕES

Após uma análise detalhada dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- a. A técnica da redução de  $C_2H_2$  foi positivamente correlacionada com o  $N$  fixado. A medida é precisa, mas certos cuidados devem ser tomados para minimizar os possíveis erros experimentais. Isto exige uma padronização na amostragem, principalmente no tempo e temperatura de incubação, uso de padrão adequado de  $C_2H_4$ , tempo de armazenamento da amostra para cromatografia, etc..
- b. Foi detectada evolução de  $H_2$  em nódulos de *P. vulgaris* com mais de 20 dias de idade. A medida foi positivamente correlacionada com fixação de  $N_2$  e redução de  $C_2H_2$ . Uma máxima evolução foi observada em nódulos com 20 a 30 dias de idade.
- c. As razões  $C_2H_2:N_2$  obtidas pelo Método I (usando as mesmas plantas para  $^{15}N_2$  e  $C_2H_2$ ) apresentaram larga faixa de variação - 3,0 a 11,4, crescente em relação com a idade, atribuindo-se em parte à evolução de  $H_2$

quando medidos em nódulos com mais de 20 dias de idade.

- d. As razões  $C_2H_2:N_2$  obtidas pelo Método II (usando diferentes plantas para  $^{15}N_2$  e  $C_2H_2$ ) mantiveram-se entre 7,4 a 8,3, para todas as idades. Foi determinada evolução de  $H_2$  nesses nódulos, sendo ela um fator decisivo para se obter um balanço equilibrado entre os três parâmetros de fixação (fixação  $^{15}N_2$ , redução de  $C_2H_2$  e evolução de  $H_2$ ).
- e. Pelo balanço eletrônico  $C_2H_2/(3N_2 + H_2)$  observou-se que ocorreu uma superestimativa da fixação real de  $N_2$  pela redução de  $C_2H_2$ , ao redor de 32 - 43%.
- f. Nódulos com 20 a 30 dias de idade proporcionaram medidas dos três parâmetros (fixação de  $^{15}N_2$ , redução de  $C_2H_2$  e evolução de  $H_2$ ) com menores variações.



## 8. SUMMARY

To measure  $N_2$ -fixation in nodules of beans (*Phaseolus vulgaris* L.), of different ages and kept under controlled light and temperature conditions, three parameters -  $^{15}N_2$ -fixation,  $C_2H_2$  reduction and  $H_2$  evolution - have been studied.

$C_2H_2$  reduction, the method for which was characterized in the laboratory, was definitely related to the  $N_2$ -fixed. It was demonstrated that a standardization for sampling is necessary and criterium should be established to keep experimental errors to a minimum. In order to greatly decrease the variation between replications, the nodules should be carefully incubated (adequate time and temperature), and also the samples should be carefully stored for chromatography.

No significant difference was found in  $C_2H_2$  reduction in the systems studied - nodulated roots, disturbed whole plants and intact plants - in the first hour of measurement.

$H_2$  evolution was detected in nodules over 20 days of age and

was definitely related to  $N_2$ -fixation and  $C_2H_2$  reduction. It was noted that it is absolutely essential to maintain the equilibrium between the three parameters in the electron balance ratio. Maximum  $H_2$  evolution occurred 20 - 30 days after planting, under phytotron conditions.

Two methods were used to obtain the ratios  $C_2H_2:N_2$  and  $C_2H_4/(3N_2 + H_2)$ . Values from 3.0 to 11.4 were obtained using the first method - incubation of disturbed whole plants. The electron balance values were over 1, varying from 1.32 to 1.43. These data suggest that overestimation of actual  $N_2$ -fixation using the  $C_2H_2$  reduction technique might be occurring. In this case, this method should be used with great care to avoid an overestimation of on average 32 - 43% of the actual value.

Variation was smaller between the measures of the three parameters when 20 - 30 days old nodules were used.

## 9. LITERATURA CITADA

- BALANDREAU, J. e Y. DOMMERGUES, 1973. Assaying nitrogenase ( $C_2H_2$ ) activity in the field. *Bull. Ecol. Res. Comm.* Stockholm, 17:247-254.
- BELL, F. e P.S. NUTMAN, 1971. Experiments on nitrogen fixation by nodulated lucerne. *Plant and Soil*, The Hague, *Special Volume*: 231-264.
- BERGERSEN, F.J., 1961. Haemoglobin content of legume root nodules. *Biochim. biophys. Acta.*, New York, 50:576-578.
- BERGERSEN, F.J., 1963. The relationship between hydrogen evolution, hydrogen exchange, nitrogen fixation, and applied oxygen tension in soybean root nodules. *Aust. J. biol. Sci.*, Melbourne, 16:669-680.
- BERGERSEN, F.J., 1970. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. *Aust. J. biol. Sci.*, Melbourne, 23:1015-1025.
- BERGERSEN, F.J., 1973. The use <sup>15</sup>N in N<sub>2</sub>-fixation experiments. Campinas, Instituto Agrônômico de Campinas, 39 p. (mimeografado).

- BERGERSEN, F.J. e G.L. TURNER, 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochim. biophys. Acta*, New York, 141:507-515.
- BERKUM, P. van, 1976. Gas-liquid chromatography and the acetylene reduction assay. Curso Intensivo sobre Fixação de Nitrogênio nos Trópicos, Embrapa - Km 47, Rio de Janeiro, 26 p.
- BETHLENFALVAY, G.J. e D.A. PHILLIPS, 1977a. Photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.. In: Hollaender A. ed., *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*, Plenum Press, Basic Life Sciences, New York. 9:333-354.
- BETHLENFALVAY, G.J. e D.A. PHILLIPS, 1977b. Ontogenetic interactions between photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Plant Physiol.*, Bethesda 60:419-421.
- BROCKWELL, J., 1971. An appraisal of an IBP experiment on nitrogen fixation by nodulated legumes. *Plant and Soil*, The Hague, *Special Volume*:265-272.
- BULEN, W.A., R.C. BURNS e J.R. Lecomte, 1965. Nitrogen fixation: hydrosulfite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington. 53:532-539.
- BURNS, R.C. e R.W.F. HARDY, 1975. *Nitrogen fixation in bacteria and higher plants*. Springer-Verlag, Ed., New York, 189 p.

- BURRIS, R.H., 1972. Nitrogen Fixation - Assay Methods and Techniques. In: ed. A. San Pietro, *Methods Enzymol.*, Academic Press, New York, 24:415-431.
- BURRIS, R.H., 1974a. Methodology. In: A. Quispel ed., *The Biology of Nitrogen Fixation*, North-Holland Publ. Co., Amsterdam, 9 - 33.
- BURRIS, R.H., 1974b. Biological Nitrogen Fixation, 1924 - 1974. *Plant Physiol.*, Bethesda, 54:443-449.
- BURRIS, R.H., F.J. EPPLING, H.B. WAHLIN e P.W. WILSON, 1942. Studies of biological nitrogen fixation with isotopic nitrogen. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* Madison, 7:258-262.
- BURRIS, R.H. e C.E. MILLER, 1941. Application of N<sup>15</sup> to the study of biological nitrogen fixation. *Science*, New York, 93:114-115.
- BURRIS, R.H. e P.W. WILSON, 1957. Methods for measurement of nitrogen fixation. In: *Methods Enzymol.*, New York, 4:355-366.
- CAMARGO, O.A., 1971. Contribuição ao estudo de ar do solo. ESALQ-USP, Piracicaba, 61 p. (Dissertação de Mestrado).
- CARNAHAN, J.E., L.E. MORTENSON, H.F. MOWER e J.E. CASTLE, 1960. Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. biophys. Acta.* New York, 44:520-535.
- CARTER, K.R., N.T. JENNINGS, J. HANUS e H.J. EVANS, 1978. Hydrogen evolution and uptake by nodules of soybeans inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* Ottawa, 24:307-311.

- CRISWELL, J.G., R.W.F. HARDY e U.D. HAVELKA, 1976. Nitrogen fixation in soybeans: measurements techniques and examples of applications. *World Soybean Research*, 108-124.
- DART, P.J. e J.M. DAY, 1971. Effects of incubation temperature and oxygen tension on nitrogenase activity of legume root nodules. *Plant and Soil*. The Hague, *Special Volume*:167-184.
- DILWORTH, M.J., 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. biophys. Acta*. New York, 127: 285-294.
- DIXON, R.O.D., 1968. Hydrogenase in pea root nodule bacteroids. *Arch. Mikrobiol.*, Berlin, 62:272-283.
- DIXON, R.O.D., 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. *Arch. Mikrobiol.* Berlin, 85:193-201.
- DÖBEREINER, J., 1966. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature*, London. 210: 850-852.
- DUCATTI, C., H. De POLLI e P.C.O. TRIVELIN, 1974. Espectrômetro de massa da Varian-MAT-CH4. CENA, Piracicaba, 24 p. (mimeografado).
- EVANS, H.J. e L.E. BARBER, 1977. Biological nitrogen fixation for food and fiber production. *Science*, New York. 197:332-339.

- EVANS, H.J., T. RUIZ-ARGÜESO, N. JENNINGS e J. HANUS, 1977. Energy coupling efficiency of symbiotic nitrogen fixation. In: Hollaender, A. ed, *Genetic Engineering for Nitrogen Fixation*, Plenum Press, New York, Basic Life Sciences, 9:333-354.
- FIEDLER, R. e G. PROKSCH, 1972. Emission spectrometry for routine analysis of nitrogen-15 in Agriculture. *Plant and Soil*, The Hague, 36:371-378.
- FISHBECK, K., H.J. EVANS e L.L. BOERSMA, 1973. Measurement of nitrogenase activity of intact legume simbiotes *in situ* using the acetylene reduction assay. *Agron. J.* Washington. 65:429-433.
- FLETT, R.J., J.W.M. RUDD e R.D. HAMILTON, 1975. Acetylene reduction assays for nitrogen fixation in freshwaters: a note of caution. *Appl. Microbiol.*, Baltimore. 29:580-583.
- GIBSON, A.H., 1974. Consideration of the growing legume as a symbiotic association. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad.*, Bangalore. 40, part B n° 6:741-767.
- GRAHAM, P.H. e J. HALLIDAY, 1977. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. In: *Exploiting the Legume - Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture*, NifTAL Project, Hawaii, College of Tropical Agriculture Misc. Publ. 145:313-334.
- HALLIDAY, J., 1976. Energy and Nitrogen Fixation. VIII Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*, CIAT, Cali, Colombia.

HAM, G.E., I.E. LIENER, S.D. EVANS, R.D. FRAZIER e W.W. NELSON, 1975.

Yield and composition of soybean seed as affected by N and S fertilization.

*Agron. J.*, Washington, 67:293-297.

HARDY, R.W.F., R.C. BURNS, R.R. HEBERT, R.D. HOLSTEN e E.K. JACKSON, 1971.

Biological nitrogen fixation: a key to world protein. *Plant and Soil*,

The Hague. *Special Volume*: 561-590.

HARDY, R.W.F., R.C. BURNS e R.D. HOLSTEN, 1973. Applications of the

acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil*

*Biol. Biochem.*, Oxford, 5: 47-81.

HARDY, R.W.F., J.G. CRISWELL e U.D. HAVELKA, 1977. Investigations of

possible limitations of nitrogen fixation by legumes: (1) Methodology,

(2) Identification, and (3) Assessment of significance. *In: Newton, W.,*

*Postgate J.R. e Rodríguez-Barrueco, C.*, ed. Academic Press, London, 451-  
-467.

HARDY, R.W.F. e E.K. JACKSON, 1967. Reduction of model substrates-nitriles

and acetylenes - by nitrogenase ( $N_2$ ase). *Federation Proc.*, Baltimore,

24:725.

HARDY, R.W.F., R.D. HOLSTEN, E.K. JACKSON e R.C. BURNS, 1968. The acetylene

-ethylene assay for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation. *Plant*

*Physiol.*, Bethesda, 43:1185-1207.

HARDY, R.W.F. e E. KNIGHT Jr., 1966. Reduction of  $N_2O$  by biological  $N_2$  -

-fixing systems. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, New York, 23:409-414.



- HARDY, R.W.F. e E. KNIGHT Jr., 1967. ATP - dependent reduction of azide and HCN by  $N_2$ -fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. biophys. Acta*, New York, 139:69-90.
- HAUCK, R.D. e J.M. BREMMER, 1976. Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. *Adv. Agron.* New York, 28:219-266.
- HELLRIEGEL, H. e H. WILFARTH, 1888. Untersuchungen über die stickstoffnahrung der Gramineen und Leguminosen. Beilageheft zu der Ztschr. Ver. Rübezucker-Industrie Deutschen Reichs, 234 p.
- HOCH, G.E., H.N. LITTLE e R.H. BURRIS, 1957. Hydrogen evolution from soybean root nodules. *Nature*, London, 179:430-431.
- HOCH, G.E., K.C. SCHNEIDER e R.H. BURRIS, 1960. Hydrogen evolution and exchange, and conversion of  $N_2O$  to  $N_2$  by soybean root nodules. *Biochim. biophys. Acta*, New York, 37:273-279.
- HUANG, C.Y., J.S. BOYER e L.N. VANDERHOEF, 1975. Acetylene reduction (nitrogen fixation) and metabolic activities of soybean having various leaf and nodule water potentials. *Plant Physiol.*, Bethesda, 56:222-227.
- HURWITZ, C. e P.W. WILSON, 1940. Direct estimation of biological nitrogen fixation. A gasometric method. *Ind. and Eng. Chem.*, Anal. Ed., Easton, 12:31-33.
- HWANG, J.C., C.H. CHEN e R.H. BURRIS, 1973. Inhibition of nitrogenase-catalysed reductions. *Biochim. biophys. Acta*, New York, 292:256-270.
- JOFFE, A. e C.E.M. TIDMARSH, 1961. The used of controlled enviroments for plant growth studies. *Jl. S. Afr. biol. Soc.*, Pretoria, 2:29-35.

- JOHNSON, H.S. e D.J. HUME, 1973. Comparisons of nitrogen fixation estimates in soybeans by nodule weight, leghemoglobin content, and acetylene reduction. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 19:1165-1168.
- KAVANAGH, E.P. e J.R. POSTGATE, 1970. Absorption and release of hydrocarbons by rubber closures: a source of error in some biological assays. *Lab. Practice*, London, 19: 159-160.
- KELLY, M., J.R. POSTGATE e R.L. RICHARDS, 1967. Reduction of cyanide and isocyanide by nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*. *Biochem. J.*, Cambridge, 102:1c - 3c.
- KENNEDY, I.R., C.A. PARKER e D.K. KIDBY, 1966. The probable site of nitrogen fixation in root nodules of *Ornithopus sativus*. *Biochim. biophys. Acta*, New York, 130:517-519.
- KOCH, B. e H.J. EVANS, 1966. Reduction of acetylene to ethylene by soybean root nodules. *Plant Physiol.*, Bethesda, 41:1748-1749.
- MacRAE, I.C., 1975. Assessment of  $C_2H_2:N_2$  molar ratios of detached *Phaseolus vulgaris* nodules using emission spectrometry for  $^{14}N:^{15}N$  determinations. *Soil biol. Biochem.*, Oxford, 7: 239-240.
- MAGUE, T.H. e R.H. BURRIS, 1972. Reduction of acetylene and nitrogen by field-grown soybeans. *New Phytol.*, Cambridge. 71:275-286.
- MAHON, J.D., 1977a. Root and nodule respiration in relation to acetylene reduction in intact nodulated peas. *Plant Physiol.*, Bethesda, 60:812-816.
- MAHON, J.D., 1977b. Respiration and the energy requirement for nitrogen fixation in nodulated pea roots. *Plant Physiol.*, Bethesda, 60:817-821.

- McKNIGHT, T., 1949. Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cowpea group, with proposed additions to this group. *Qld. J. Agric. Sci.*, Brisbane, 6 (2):61-76.
- MINCHIN, F.R. e J.S. PATE, 1974. Diurnal functioning of the legume root nodule. *J. Exptl. Bot.*, Oxford, 25:295-308.
- MINCHIN, F.R. e J.S. PATE, 1975. Effects of water, aeration, and salt regime on nitrogen fixation in a nodulated legume - definition of an optimum root environment. *J. Exptl. Bot.*, Oxford, 26:60-69.
- NICHOLAS, D.J.D., D.J. SYLVESTER e J.F. FOWLER, 1961. Use of radioactive nitrogen in studying nitrogen fixation in bacterial cells and their extracts. *Nature*, London, 189:634-636.
- OGHOGHORIE, C.G.O. e J.S. PATE, 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). *Plant and Soil*, The Hague. *Special Volume*: 185-202.
- PETERS, G.A., R.E. TOIA Jr. e S.M. LOUGH, 1977. Azolla-Anabaena azollae relationship V.  $^{15}\text{N}_2$  fixation, acetylene reduction, and  $\text{H}_2$  production. *Plant Physiol.*, Bethesda, 59: 1021-1025.
- PIMENTEL GOMES, F., 1968. *Iniciação à Estatística*. 2a. Edição, Livraria Nobel, São Paulo.
- PIMENTEL GOMES, F., 1973. *Curso de Estatística Experimental*, 5a. edição, Livraria Nobel S/A, São Paulo, 430 p.

- REPORTER, M., 1978. Hydrogen ( $H_2$ ) Evolution by Rhizobia after Synergetic Culture with Soybean Cell Suspensions. *Plant Physiol.*, Bethesda, 61: 753-756.
- RIVERA-ORTIZ, J.M. e R.H. BURRIS, 1975. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. *J. Bacteriol.*, Baltimore. 123:537-545.
- ROUGHLEY, R.J. e P.J. DART, 1969. Reduction of acetylene by nodules of *Trifolium subterraneum* as affected by root temperature, *Rhizobium* strain and host cultivar. *Arch. Microbiol.*, Berlin, 69:171-179.
- RUBEN, S., W.Z. HASSID e M.D. KAMEN, 1940. Radioactive nitrogen in the study of  $N_2$  fixation by non-leguminous plants. *Science*, New York, 91: 578-579.
- RUSCHEL, A.P. e R. RUSCHEL, 1975. Avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio em feijão. *Pesq. agropec. bras.*, Sér. Agron., Rio de Janeiro. 10:11-17.
- SCHÖLLHORN, R. e R.H. BURRIS, 1966. Studies of intermediates in nitrogen fixation. *Federations Proc.*, Baltimore, 25:710.
- SCHÖLLHORN, R. e R.H. BURRIS, 1967. Acetylene as a competitive inhibitor of  $N_2$  fixation. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, 58:213-216.
- SCHRAUZER, G.N., 1977. Nitrogenase model systems and the mechanism of biological nitrogen reduction: advances since 1974. In: Newton, W., Postgate, J.R., Rodriguez-Barrueco, C. ed., *Recent Developments in Nitrogen Fixation*, Academic Press, London: 109-118.

- SCHUBERT, K.R. e H.J. EVANS, 1976. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbiots. *Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Washington, 73:1207-1211.
- SCHUBERT, K.R. e H.J. EVANS, 1977. The relation of hydrogen reactions to nitrogen fixation in nodulated symbionts. In: Newton, W., Postgate, J. R., Rodriguez-Barrueco, C., ed., *Recent Developments in nitrogen fixation*. Academic Press, London: 469-485.
- SINCLAIR, A.G., 1973. Non-destructive acetylene reduction assay of nitrogen fixation applied to white clover plants growing in soil. *N.Z. Jour. of Agric. Research*, Wellington, 16:263-270.
- SINCLAIR, A.G., R.B. HANNAGAN e W.H. RISK, 1976. Evaluation of the acetylene-reduction assay of nitrogen fixation in pastures using small soil-core samples. *N.Z. Jour. of Agric. Research*, Wellington. 19:451-458.
- SMITH, L.A., S. HILL e M.G. YATES, 1976. Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen-fixing bacteria. *Nature*, London, 262:209-210.
- SPRENT, J.I., 1969. Prolonged reduction of acetylene by detached soybean nodules. *Planta*, Berlin, 88:372-375.
- SPRENT, J.I., 1971. Effects of water stress on nitrogen fixation in root nodules. *Plant and Soil*, The Hague. *Special Volume*: 225-228.

- SPRENT, J.I. e W.B. SILVESTER, 1973. Nitrogen fixation by *Lupinus arboreus* grow in the open and under different aged stands of *Pinus radiata*. *New Phytol.*, Cambridge, 72:991-1003.
- STEFANSON, R.C., 1970. Sealed growth chambers for studies of the effects of plants on the soil atmosphere. *J. agric. Engng. Res.*, Silsoe. 15 (3):295-301.
- STEWART, W.D.P., G.P. FITZGERALD e R.H. BURRIS, 1967. *In situ* studies on N<sub>2</sub> fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. natl. Acad. Sci.*, U.S.A., Washington, 58:2071-2078.
- STEWART, W.D.P., G.P. FITZGERALD e R.H. BURRIS, 1968. Acetylene reduction by nitrogen-fixing blue-green Algae. *Arch. Mikrobiol.*, Berlin, 62:336-348.
- TRIVELIN, P.C.O., E. SALATI e E. MATSUI, 1973. Preparo de amostras para análises de <sup>15</sup>N por expetrometria de massa. Boletim Técnico, nº 2, CENA-ESALQ-USP, CNEN, 41 p.
- TURNER, G.L. e F.J. BERGERSEN, 1969. The relationship between nitrogen fixation and the production of HD from D<sub>2</sub> by cell-free extracts of soya-bean nodule bacteroids. *Biochem. J.*, Cambridge. 115:529-535.
- VEST, G., 1971. Nitrogen increases in a non-nodulating soybean genotype grown with nodulating genotypes. *Agron. J.*, Washington, 63:356-359.
- VICTÓRIA, R.L., 1975. Uso de <sup>15</sup>N<sub>2</sub> com baixo enriquecimento para testes de fixação simbiótica. ESALQ-USP, Piracicaba, 93 p. (Dissertação de Mestrado).

YATES, M.G., 1976a. Physiological Aspects of Nitrogen Fixation. In: Newton, W., Postgate, J.R. e Rodriguez-Barrueco, C., eds. *Recent Developments in Nitrogen Fixation*, Academic Press, New York, 219-270.

YATES, M.G., 1976b. Nitrogen Fixation. *Trends in Biochem. Sciences*, 1:17-20.

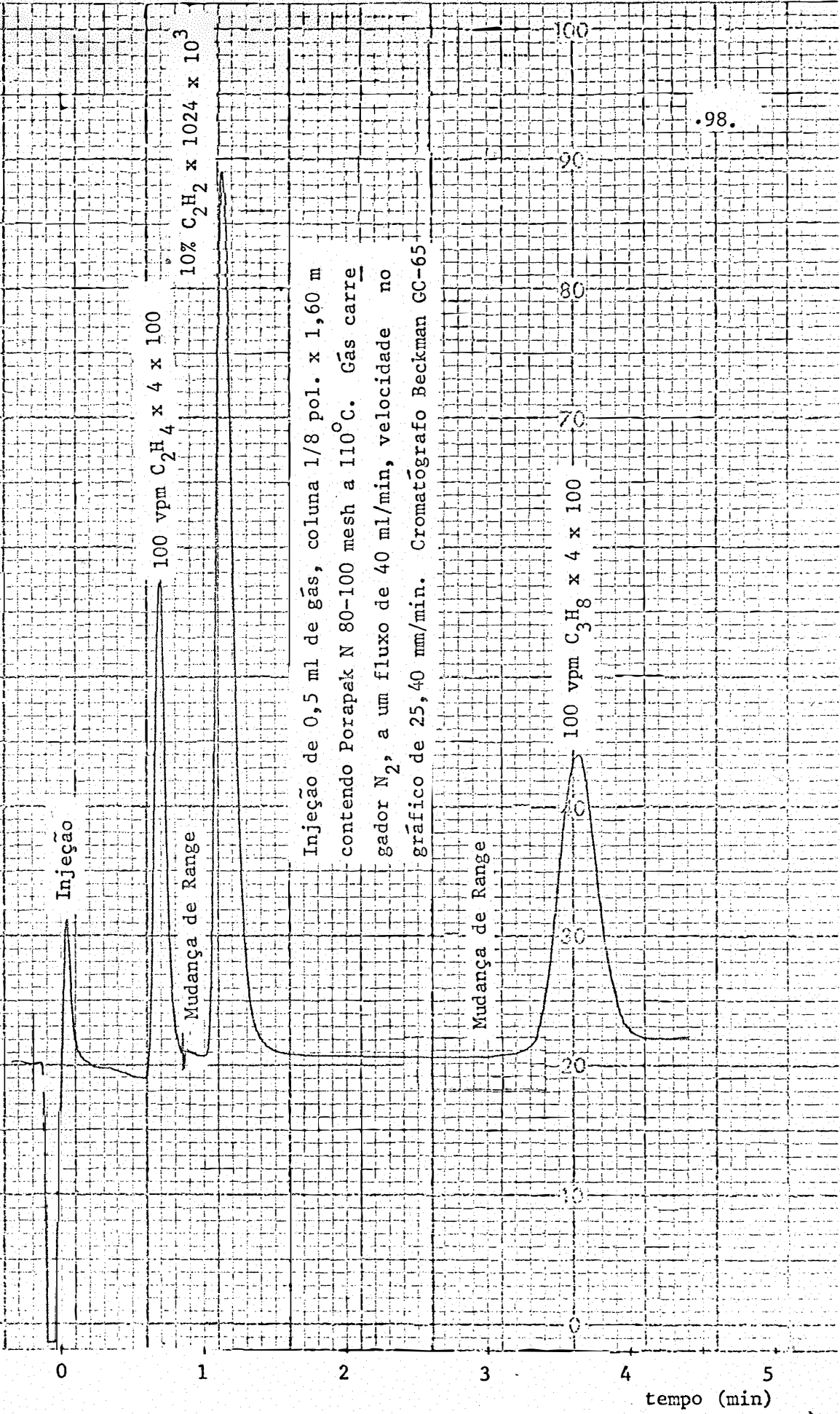
WEBER, C.R., 1966. Nodulating and nonnodulating soybean isolines: I. Agronomic and Chemical Attributes. *Agron. J.*, Washington, 58:43-46.

WILSON, D.O. e H.M. REISENAUER, 1963. Determination of leghemoglobin in legume nodules. *Anal. Biochem.*, New York. 6:27-30.

ZELITCH, I., 1975. Improving the efficiency of photosynthesis. *Science*, New York, 188:626-633.

APËNDICE





Injeção de 0,5 ml de gás, coluna 1/8 pol. x 1,60 m contendo Porapak N 80-100 mesh a 110°C. Gás carregador N<sub>2</sub>, a um fluxo de 40 ml/min, velocidade no gráfico de 25,40 mm/min. Cromatógrafo Beckman GC-65

Cromatograma em análises de redução de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>